



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE CD69 EN EL BALANCE T_H17 / T_{reg}
MEDIADO POR miRNAs**

Adela Matesanz Marín

Madrid, 2015



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**PAPEL DE CD69 EN EL BALANCE T_H17 / T_{reg}
MEDIADO POR miRNAs**

Memoria presentada por la licenciada en Biología:

Adela Matesanz Marín

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) bajo la dirección de la Dra. María Pilar Martín Fernández.

A Claudio

A mis padres y hermanas

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Pilar Martín y Francisco Sánchez Madrid que me dieran la oportunidad de realizar el doctorado.

También agradezco a todas aquellas personas del CNIC que con su profesionalidad, su bondad o su simpatía me hicieron más agradables los años que trabajé en el centro. Sobre todo a mis compañeros de laboratorio, por su complicidad, su espíritu colaborativo y por lo mucho que me hicieron reír. Tampoco puedo dejar de mencionar a muchas personas de los demás grupos de “la 2ª norte” que siempre crearon un buen ambiente de trabajo y con los que pasé muy buenos ratos. Y cómo no, a mi compañera y amiga Helena por su comprensión, su sinceridad y por todo lo que hemos compartido y seguiremos compartiendo.

Pero sobre todo quiero agradecer de todo corazón a mi familia y a Claudio su apoyo incondicional en todo momento porque sin ellos no habría encontrado las fuerzas necesarias para seguir adelante cada día y llegar a ser quien soy.

“El verdadero amor no es otra cosa que el deseo inevitable de ayudar al otro para que sea quien es”

Jorge Bucay

RESUMEN

RESUMEN

El antígeno de activación leucocitario CD69 es un modulador negativo de la respuesta inmune inflamatoria, que inhibe la diferenciación y la función de las células T_H17 . Los ratones deficientes en CD69 muestran una inflamación exacerbada en los modelos animales de artritis inducida por colágeno, asma alérgico, dermatitis por contacto, miocarditis autoinmune y colitis. Dado que el equilibrio entre las células T_H17 y Tregs es crítico para la regulación de la respuesta inmune, uno de los objetivos de esta tesis fue investigar el papel de CD69 en la diferenciación de las células Tregs naturales e inducibles en el modelo murino de CD69, así como en su capacidad para inducir tolerancia. De esta forma se ha observado que la expresión de CD69 es crítica tanto para la generación de las células nTreg en el timo como para la función supresora de las mismas, a través de la inducción de la secreción de IL-10.

Por otro lado, los microRNAs (miRNAs) desempeñan un papel crítico en la regulación del sistema inmune, controlando la diferenciación y funciones inmunológicas de muchos tipos celulares. La expresión o función de los miRNAs se encuentra alterada en muchas enfermedades inflamatorias y cardiovasculares, por lo que constituyen una herramienta muy útil como biomarcadores y/o dianas terapéuticas. Numerosos trabajos relacionan las células T_H17 y Tregs con enfermedades cardiovasculares, sin embargo, el papel de los miRNAs presentes en estas células está prácticamente inexplorado en estas patologías. Por ello, otro de los objetivos de esta tesis fue investigar la regulación de la expresión de miRNAs y sus dianas predictivas mediada por CD69 en los linfocitos $CD4^+$ naive, T_H17 y Treg, así como su papel en el modelo animal de miocarditis experimental autoinmune (EAM) y en pacientes con miocarditis y cardiomiopatías. Así se ha comprobado que CD69 regula diferencialmente la expresión de miR-721 en las células $CD4^+$ naive, T_H17 y Tregs. En el modelo de EAM, se ha encontrado que la expresión de miR-721 en el suero y en el miocardio de los ratones se correlaciona con la severidad de la enfermedad, sugiriendo que CD69 podría controlar la respuesta pro-inflamatoria T_H17 en la EAM mediante la regulación de miR-721. En línea con estas observaciones, también se ha descrito que los porcentajes de linfocitos T $CD4^+$, T_H17 y Treg en sangre están alterados en los pacientes con miocarditis y cardiomiopatías dilatadas y que los niveles de expresión de miR-721 en el plasma de los pacientes están muy aumentados respecto a los niveles normales de los individuos sanos.

Todos estos datos corroboran el papel de CD69 como modulador negativo de la respuesta inmune inflamatoria y señalan un nuevo rol de CD69 en el control de la respuesta pro-inflamatoria T_H17 en la miocarditis mediante la regulación del microRNA miR-721.

SUMMARY

SUMMARY

The leukocyte activation antigen CD69 is a negative modulator of the inflammatory immune response that inhibits the differentiation and function of T_H17 cells. CD69 deficient mice show an exacerbated inflammation in animal models of collagen-induced arthritis, allergic asthma, contact dermatitis, autoimmune myocarditis, and colitis. Since the balance between Tregs and T_H17 is critical for the regulation of the immune response, one of the objectives of this thesis was to investigate the role of CD69 in the differentiation of natural and inducible Tregs in the murine model of CD69, as well as its capacity to induce tolerance. Thus it has been observed that expression of CD69 is critical to both the generation of nTreg cells in the thymus and their suppressor capacity, through the induction of IL-10 secretion.

On the other hand, microRNAs (miRNAs) play a critical role in regulating the immune system, controlling differentiation and immune functions of many cell types. The expression or function of miRNAs are altered in many inflammatory and cardiovascular diseases, which are a very useful tool as biomarkers and/or therapeutic targets. Numerous articles relate T_H17 and Tregs with cardiovascular diseases, however, the role of miRNAs present in these cells is largely overlooked in these pathologies. Therefore, another objective of this thesis was to investigate the regulation of the expression of miRNAs and their predictive targets mediated CD69 in CD4⁺ naive, T_H17 and Treg cells and their role in the animal model of experimental autoimmune myocarditis (EAM) and in patients with myocarditis and cardiomyopathies. Thus it has been found that CD69 differentially regulates expression of miR-721 in CD4⁺ naive, T_H17 and Tregs. In the model of EAM, it has been found that the expression of miR-721 in serum and myocardium of mice correlates with disease severity, suggesting that CD69 could control T_H17 pro-inflammatory response in the EAM by the regulation of miR-721. In line with these observations, it has also been described that the percentages of CD4⁺, T_H17 and Treg lymphocytes in blood are altered in patients with myocarditis and dilated cardiomyopathies and expression levels of miR-721 in the plasma of patients are greatly increased over normal levels of healthy individuals.

All these data support the role of CD69 as a negative modulator of the immune response and point at a new role of CD69 in the control of pro-inflammatory T_H17 response in myocarditis by regulating the microRNA miR-721.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY	3
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	11
1) Las respuestas inmunes	12
2) Los linfocitos colaboradores T _H 17	13
2.1. Origen y diferenciación de los linfocitos T _H 17	14
2.2. Funciones de los linfocitos T _H 17.....	15
3) Las células T reguladoras	16
3.1. Caracterización molecular de las células T reguladoras.....	16
3.2. Origen y diferenciación de las Treg	17
3.3. Mecanismos de acción de los linfocitos T reguladores	18
4) El antígeno de activación leucocitario CD69	19
4.1. Localización y estructura de CD69	19
4.2. Expresión <i>in vivo</i> de CD69.....	20
4.3. Papel inmunoregulador de CD69	21
5) Los microRNAs.....	25
5.1. Biogénesis de los microRNAs.....	25
5.2. Función reguladora de los microRNAs	26
6) El supresor de señalización de citoquinas 1 (SOCS1).....	27
7) El receptor de aril-hidrocarburos (AHR).....	28
8) La miocarditis y el modelo de miocarditis experimental autoinmune (EAM)	30
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Ratones	36
2. Cultivos primarios	36
3. Aislamiento de linfocitos de sangre periférica de ratón	37
4. Ensayos de proliferación celular	37
5. Ensayos de supresión	37
6. Cultivos organotípicos de timos fetales (FTOCs)	38
7. Cuantificación de citoquinas secretadas.....	38
8. Pacientes y voluntarios sanos.....	38
9. Aislamiento de linfocitos de sangre periférica de pacientes	39

10.	Extracción de miRNAs de sangre periférica de pacientes.....	39
11.	Extracción de RNA de tejidos y suspensiones celulares.....	39
12.	Análisis por PCR cuantitativa	40
13.	Microarray de microRNAs.....	40
14.	Inmunoelectroforesis (Western Blot)	41
15.	Inducción de la miocarditis experimental autoinmune (EAM)	41
16.	Tomografía Molecular de Fluorescencia (FMT).....	42
17.	Análisis estadísticos	42
RESULTADOS.....		43
1.	Papel de CD69 en el desarrollo de las células nTregs y en la diferenciación y la función de las células iTregs.	45
2.	Regulación de la expresión de miRNAs mediada por CD69 en T _H 17 y Tregs	52
3.	Estudio de la expresión de las dianas predictivas de miR-721 y miR-155.	59
4.	Estudio de la expresión de MIR721 y MIR155 en el modelo animal de miocarditis experimental autoinmune.	63
5.	Análisis de linfocitos T _H 17, células T reguladores y expresión de miRNAs en plasma de pacientes con cardiomiopatías.....	68
DISCUSIÓN		72
1.	Papel de CD69 en el desarrollo de las células Tregs naturales y en la diferenciación, el fenotipo y la funcionalidad de las células Tregs inducibles	73
2.	Regulación de la expresión de miRNAs mediada por CD69 en los linfocitos T _H 17 y las células T reguladoras.....	75
3.	Estudio de las posibles dianas reguladas por miR-721 y miR-155	77
4.	Papel de los miRNAs mediado por CD69 en el modelo animal de miocarditis experimental autoinmune	79
5.	Análisis de linfocitos T _H 17, células T reguladoras y expresión de miRNAs en la sangre de pacientes con cardiomiopatías.....	84
CONCLUSIONES		88
BIBLIOGRAFÍA.....		91
ANEXOS.....		109
ANEXO I: Artículos publicados		110
ANEXO II: Material suplementario.....		111

ABREVIATURAS

Algunas de las abreviaturas utilizadas corresponden a definiciones en inglés y se han mantenido para conservar la nomenclatura estándar.

AHR: receptor de aril-hidrocarburos (*Aryl Hydrocarbon Receptor*)

ANOVA: análisis de la varianza (*ANalysis Of Variance*)

APCs: células presentadoras de antígenos (*Antigen-Presenting Cells*)

CD122: cadena β del receptor de la IL-2

CD127: cadena α del receptor de la IL-7

CD25: cadena α del receptor de la IL-2

CD4SP: células CD4⁺ simples positivas

CD69KO: células o ratones deficientes en CD69

CFA: *Complete Freund's Adjuvant*

CHS: hipersensibilidad por contacto (*Contact Hypersensitivity*)

CIA: artritis inducida por colágeno (*Collagen-Induced Arthritis*)

CTLA-4: antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*)

CTLD: dominio de lectina tipo C (*C-Type Lectin-like Domain*)

CVB3: virus Cocksackie B3

DCM: cardiomiopatía dilatada inflamatoria (*Dilated CardioMyopathy*)

DCs: células dendríticas (*Dendritic Cells*)

EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental (*ExperimentalAutoimmune Encephalomyelitis*)

EAM: miocarditis experimental autoinmune (*Experimental Autoimmune Myocarditis*)

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

ER: receptor de estrógeno (*Estrogen Receptor*)

FICZ: 6-formylindolo [3,2-b] carbazol

FMT: Tomografía Molecular de Fluorescencia (*Fluorescence Molecular Tomography*)

FoxP3: *Forkhead box Protein 3*

FTOC: cultivo organotípico de timos fetales (*Fetal Thymus Organ Culture*)

GITR: receptor de TNF- α inducido por glucocorticoides (*Glucocorticoid-Induced TNF Receptor*)

GVHD: enfermedad de injerto contra huésped (*Graft-Versus-Host-Disease*)

HDL: lipoproteínas de alta densidad (*High Density Lipoprotein*)

HF-REF: insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida (*Heart Failure-Reduced Ejection Fraction*)

HIF1- α : factor-1 alfa inducible por hipoxia (*Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha*)

IDO: indoleamina 2, 3-dioxigenasa

IFN- γ : interferón-gamma

IL: interleuquina

IPEX: Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado al cromosoma X

IRF-4: factor regulador del interferón 4 (*Interferon Regulatory Factor 4*)

ITE: ácido 2-(1'-indol-3-carbonil)-tiazol-4-carboxílico

ITK: quinasa de células T inducible por IL-2 (*Interleukin-2-inducible T-cell Kinase*)

iTreg: linfocitos T reguladores inducibles

mAb: anticuerpos monoclonales (*monoclonal Antibodies*)

MHC: complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)

miRISC: complejo de silenciamiento inducido por miRNA (*miRNA-Induced Silencing Complex*)

miRNA: microRNA

mRNA: RNA mensajero

MyHC- α : cadena pesada de la miosina- α cardíaca (*alpha-Myosin Heavy Chain*)

myomiRs: microRNAs específicos del músculo

NF- κ B: factor nuclear kappa beta

NKs: células *Natural Killer*

nTreg: linfocitos T reguladores naturales

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PHA: fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin*)

PKC: proteína quinasa C (*Protein Kinase C*)

RA: ácido retinoico (*Retinoic Acid*)

ROR α : receptor nuclear huérfano relacionado con el ácido retinoico alfa (*RAR-Related Orphan Receptor alpha*)

ROR γ t: factor de transcripción nuclear huérfano relacionado con el ácido retinoico gamma t (*Retinoic Acid-Related Orphan Receptor gamma t*)

Runx1: factor de transcripción relacionado con Runt 1 (*Runt-related transcription factor 1*)

S1P₁: receptor de la esfingosina 1-fosfato 1 (*Sphingosine-1-phosphate receptor 1*)

SDS: dodecilsulfato sódico

SOCS: supresores de señalización de citoquinas (*Suppressors Of Cytokine Signaling*)

STATs: transductores de señal y activadores de la transcripción (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)

T³H: timidina tritiada

TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina

TCR: receptor de los linfocitos T (*T Cell Receptor*)

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

T_H: linfocitos T colaboradores (*T helper*)

TLR: *Toll Like Receptor*

TNF: factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

Tr1: células T reguladoras tipo 1

Treg: linfocitos T reguladores

UTR: región sin traducir (*UnTranslated Region*)

INTRODUCCIÓN

1) Las respuestas inmunes

La respuesta inmune es la reacción coordinada llevada a cabo por el sistema inmune como mecanismo de defensa frente a agentes extraños tales como microorganismos, macromoléculas o pequeños compuestos químicos.

Una molécula capaz de desencadenar la producción de anticuerpos se denomina antígeno. El sistema inmune actúa a través de dos tipos diferentes de respuestas o estrategias frente a los antígenos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La inmunidad innata está constituida por mecanismos capaces de establecer respuestas rápidas a los microorganismos y representan la primera línea de defensa del organismo. En contraposición existen mecanismos de defensa mucho más evolucionados que son activados tras la exposición a agentes infecciosos, y cuya intensidad y capacidad defensiva aumentan con la exposición subsiguiente a un determinado microorganismo. La inmunidad adaptativa consta de dos tipos de respuesta, la inmunidad humoral y la inmunidad celular. La inmunidad humoral está mediada por los anticuerpos, unas proteínas producidas por los linfocitos B que reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la patogenicidad de los microorganismos y los marcan como una diana para su eliminación. Mientras que la inmunidad humoral se encarga de la defensa contra los patógenos extracelulares, las infecciones intracelulares quedan a cargo de la inmunidad celular y por tanto, de los linfocitos T (Flajnik and Du Pasquier, 2004).

Las respuestas inmunitarias adaptativas constan de varias fases: el reconocimiento del antígeno, la activación de los linfocitos y la eliminación del antígeno o fase efectora. Para que los linfocitos T vírgenes (linfocitos T maduros que aún no han sido activados) puedan reconocer un antígeno, necesitan que éste sea presentado por las células presentadoras de antígenos (APCs, *Antigen-Presenting Cells*). Las APCs residen en la mayoría de órganos y tejidos de los organismos superiores y cuando entran en contacto con un agente exógeno lo fagocitan y procesan sus proteínas de manera que péptidos concretos son expuestos en su superficie unidos al complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*). Las APCs migran a los ganglios linfáticos, donde presentan el complejo MHC-antígeno que es reconocido por el receptor de los linfocitos T (TCR, *T Cell Receptor*) expresado por los mismos. El reconocimiento antigénico por el TCR desencadena una extensa vía de señalización intracelular que desencadena la activación de la célula T. Los linfocitos T activados inician una respuesta inmune sintetizando y secretando citoquinas/quimioquinas/receptores de membrana efectoras (inhibidores, activadores, costimuladores), etc. que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los propios linfocitos y de otras células efectoras (Silverstein, 2003).

Los linfocitos T se subdividen en varias poblaciones funcionalmente diferentes, de las cuales las mejor definidas son las células $CD8^+$ citotóxicas y las células $CD4^+$ colaboradoras (T_H , *T helper*). Las células T citotóxicas realizan su función defensiva eliminando las células que presentan antígenos extraños, como las células infectadas por virus u otros microorganismos intracelulares. Por su parte, las células T colaboradoras proporcionan una importante conexión entre la inmunidad adaptativa y los mecanismos efectores de la inmunidad innata, promoviendo la proliferación y diferenciación de otros linfocitos, y activando y reclutando células de la respuesta inmune innata (Silverstein, 2003).

2) Los linfocitos colaboradores T_H17

La naturaleza y modo de presentación de un determinado antígeno hace que, al ser reconocido por su TCR homólogo, la célula T virgen se diferencie hacia célula T reguladora o colaboradora. Tras el descubrimiento de la existencia de dos poblaciones distintas de células T colaboradoras (Tada et al., 1978), en 1986 Mosmann y Coffman caracterizaron por primera vez las poblaciones de células T_H1 y T_H2 atendiendo al patrón de citoquinas que producen después del reconocimiento antigénico (Mosmann et al., 1986). Las células T_H1 producen, entre otras citoquinas, interferón-gamma ($IFN-\gamma$), activan a los macrófagos y son esenciales en la inmunidad celular y contra microorganismos intracelulares. Las células T_H2 secretan interleuquina (IL)-4, IL-5 e IL-13, entre otras citoquinas, reclutan eosinófilos a los sitios de inflamación y median la inmunidad humoral contra patógenos extracelulares y en las respuestas alérgicas (Zhou et al., 2009). Más recientemente, el hallazgo de una nueva población de células T que producían preferentemente IL-17, y no $IFN-\gamma$ ni IL-4, dio lugar a la inclusión de un nuevo tipo de célula T efectora: las células T_H17 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005; Yao et al., 1995). Además de secretar IL-17 (también llamada IL-17A), las células T_H17 producen IL-17F, IL-21 e IL-22, activan a los neutrófilos y desempeñan un papel crucial tanto en la protección contra agentes infecciosos, como en la inflamación crónica y en la autoinmunidad (Fig. 1).

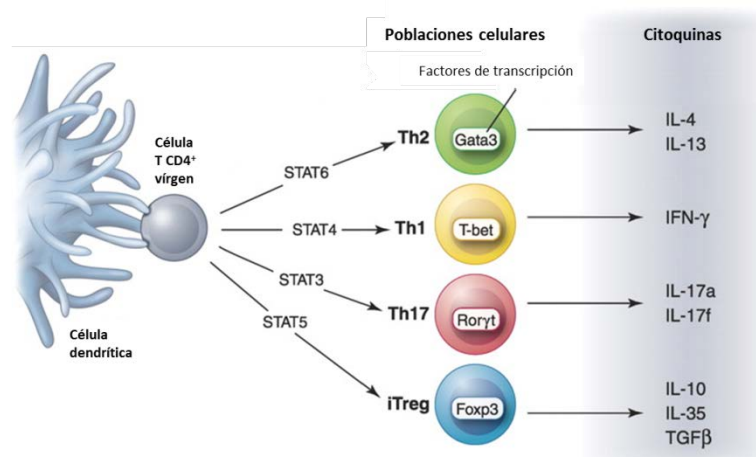


Figura 1. Modelo de diferenciación de una célula T CD4⁺ virgen en las distintas subpoblaciones de linfocitos T colaboradores (T_H, *T helper*) o T reguladores (Treg). Cuando una célula presentadora de antígenos (APC) activa una célula T CD4⁺ virgen, ésta puede diferenciarse en los distintos tipos de linfocitos T efectoros o en linfocitos T reguladores, en función de las citoquinas presentes. Cada población está caracterizada por los factores de transcripción que expresan y el patrón de citoquinas que secretan. Figura modificada de O'Shea et al., 2010 (O'Shea and Paul, 2010).

2.1. Origen y diferenciación de los linfocitos T_H17

La combinación del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la interleuquina-6 inducen la diferenciación de una célula T virgen en una célula T_H17 (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Este descubrimiento parecía contradecir la función inmunosupresora de TGF- β conocida hasta el momento: cuando una célula T virgen se expone a TGF- β expresa el factor de transcripción FoxP3 (*Forkhead box P3*) y se diferencia a célula T reguladora, un tipo celular que suprime la inflamación e inhibe la autoinmunidad (Li et al., 2006). Sin embargo, se ha demostrado que la IL-6 es un potente inhibidor de la diferenciación hacia célula T reguladora inducida por el TGF- β (Bettelli et al., 2006). Y no sólo suprime la generación de las Treg, sino que junto con el TGF- β , la IL-6 fuerza a las células T a expresar IL-17 y a diferenciarse en T_H17. Así ambas poblaciones son capaces de transdiferenciarse mutuamente: el TGF- β induce la generación de Treg, mientras que la IL-6 cambia el programa transcripcional iniciado por el TGF- β para inducir la diferenciación hacia T_H17 (Miossec et al., 2009).

La IL-23 es una citoquina producida mayormente por las células dendríticas y los macrófagos que junto con el TGF- β puede amplificar la diferenciación de las células T_H17 (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007; Zhou et al., 2007). De hecho, en ausencia de IL-23 la expansión y supervivencia de las células T_H17 es incompleta.

El principal descubrimiento por el que se considera a estas células como un tipo diferente de células T CD4 colaboradora es porque las células T_H17 son dependientes de la expresión del factor de transcripción nuclear huérfano relacionado con el ácido retinoico γ t (ROR γ t, *Retinoic Acid-Related Orphan Receptor gamma t*) (Ivanov et al., 2006), que induce la transcripción del gen IL-17 (entre otros) en las células T CD4⁺ vírgenes y es requerido para el desarrollo de las células productoras de IL-17 en presencia de IL-6 y TGF- β (Zhou et al., 2008). ROR γ t necesita actuar en cooperación con otros factores de transcripción como el receptor nuclear huérfano relacionado con el ácido retinoico α (ROR α , *RAR-Related Orphan Receptor alpha*), el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3, *Signal Transducer and*

Activator of Transcription 3), el factor regulador del interferón 4 (IRF-4, *Interferon Regulatory Factor 4*) y el factor de transcripción relacionado con Runt 1 (Runx1, *Runt-related transcription factor 1*) para la completa polarización de los precursores hacia el linaje T_H17 (Brustle et al., 2007; Yang et al., 2007; Yang et al., 2008a; Zhang et al., 2008a). La activación de ROR γ t también provoca la expresión del receptor de IL-23. La citoquina IL-23 es capaz de expandir una población de células T_H17 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005), pero dado que las células T vírgenes no expresan su receptor, IL-23 no puede diferenciar una célula virgen en una T_H17 (Mangan et al., 2006), sino que actúa en las células T ya comprometidas con el linaje T_H17 estabilizando su fenotipo (McGeachy et al., 2007).

Aunando estas evidencias, se ha propuesto un modelo de diferenciación de las células T_H17 donde TGF- β e IL-6 inducen la diferenciación, IL-21 amplifica la población e IL-23 estabiliza el fenotipo de las células ya diferenciadas. Sólo la combinación de estas tres citoquinas da lugar a una respuesta T_H17 robusta y estable (Bettelli et al., 2008).

2.2. Funciones de los linfocitos T_H17

Los linfocitos T_H17 desempeñan un papel crucial tanto en la protección contra agentes infecciosos, como en la inflamación crónica y en la autoinmunidad. La inflamación con predominio de reclutamiento de neutrófilos al tejido inflamado es típicamente mediada por T_H17. La inmunidad mediada por las células T_H17 es particularmente importante en las mucosas, tal como indica el patrón de expresión de sus receptores de quimioquinas y citoquinas efectoras, ya que las células T_H17 defienden al cuerpo frente a la infección de una gran variedad de hongos, bacterias extracelulares y otros microorganismos (Aujla et al., 2008; Ouyang et al., 2008).

La autoinmunidad es un estado de reactividad anómalo del sistema inmune frente a los antígenos propios, que aparece cuando los mecanismos de tolerancia frente a antígenos propios fallan. Además de luchar contra un gran número de patógenos, las células T_H17 son potentes inductoras de la inflamación tisular y por tanto, de la inflamación crónica y la autoinmunidad (Korn et al., 2009; Littman and Rudensky, 2010; Muranski and Restifo, 2013). En los últimos años se ha demostrado que los linfocitos T_H17 están implicados en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes tales como la psoriasis (Krueger et al., 2007), la artritis reumatoide (Kirkham et al., 2006), la esclerosis múltiple (Matusevicius et al., 1999), las enfermedades inflamatorias intestinales (Duerr et al., 2006), el asma (Barczyk et al., 2003; Molet et al., 2001), la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Komiyama et al., 2006), la artritis inducida por colágeno (AIC) (Nakae et al., 2003), la miocarditis experimental

autoinmune (EAM) (Rangachari et al., 2006; Sonderegger et al., 2006) o la hipersensibilidad por contacto (He et al., 2006; Nakae et al., 2002).

3) Las células T reguladoras

El sistema inmune ha evolucionado para constituir una eficaz defensa contra los patógenos, pero al mismo tiempo es capaz de contener la respuesta inflamatoria contra éstos o frente a antígenos propios, microorganismos comensales y alérgenos. Las células T reguladoras (Treg) son las encargadas de regular negativamente la inflamación y mantener la homeostasis del sistema inmune (Ohkura et al., 2013).

3.1. Caracterización molecular de las células T reguladoras

Además de las Treg, existen distintos tipos de células immuno-moduladoras implicados en la inhibición de la inflamación asociada a la respuesta inmune, tales como células dendríticas tolerogénicas, células supresoras mieloides, células NK (*Natural Killers*), células T CD4⁺ productoras de IL-10 o células B (Littman and Rudensky, 2010).

Las células T reguladoras CD4⁺ (Treg) se caracterizan por la expresión de la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25) en su membrana (Sakaguchi et al., 1995) y del factor de transcripción FoxP3 (*Forkhead box Protein 3*), indispensable para la diferenciación de las Treg y su función supresora (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003; Wan and Flavell, 2007). La relevancia del factor de transcripción FoxP3 queda de manifiesto en el síndrome IPEX (Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado al cromosoma X), un trastorno muy grave provocado por un desarrollo anormal de los linfocitos T reguladores como consecuencia de mutaciones en el gen FOXP3 (Kobayashi et al., 2001).

CD25 y FoxP3 no pueden considerarse marcadores específicos de las Treg porque las células T efectoras humanas expresan CD25 y FoxP3 de forma inducible cuando son activadas (Kmieciak et al., 2009). Con el objetivo de caracterizar un marcador de las células Treg que facilite su aislamiento y estudio se han identificado varios marcadores que, aunque no son exclusivos porque otras células no reguladoras también los expresan, son expresados altamente por las Treg tanto humanas como murinas: CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*), implicado en la función supresora de las Treg y en el control de la homeostasis inmune (Read et al., 2000); GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor*), un miembro de la familia de los receptores de TNF que juega un papel importante en el control de la función de las Treg y sirve como molécula coestimuladora y de supervivencia en las células T efectoras (McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002); CD27, otro miembro de la familia de los receptores de TNF que se

expresa en las células T vírgenes y desaparece en las células T efectoras, pero se sigue expresando en las células T reguladoras (Mack et al., 2009; Ruprecht et al., 2005); y CD39 y CD73, dos ectoenzimas altamente expresadas en las células Treg que toman parte en su función supresora facilitando la elaboración de adenosina y la síntesis de cAMP (Deaglio et al., 2007). Además se ha descrito que en presencia de CD4 y CD25, la ausencia o baja expresión de CD127 (la cadena α del receptor de la IL-7) es un rasgo de las células Treg que permite discriminarlas de las células T efectoras activadas (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006).

Las células T reguladoras humanas y de ratón expresan en su membrana todas estas moléculas, pero las Treg humanas además expresan unos marcadores que las dividen en dos subtipos de células reguladoras: las células Treg vírgenes ($CD4^+ CD25^+ FoxP3^+ CD45RA^+$) y las células Treg de memoria ($CD4^+ CD25^+ FoxP3^+ CD45RO^+$) (Booth et al., 2010).

3.2. Origen y diferenciación de las Treg

Las Treg se dividen en dos grupos en función de su origen. Las células Treg derivadas del timo o Treg naturales (nTreg) se generan en el timo y migran a los tejidos periféricos, mientras que las células Treg derivadas de la periferia o Treg inducibles (iTreg) se diferencian en los tejidos y órganos linfoides secundarios (Abbas et al., 2013). Ambos tipos componen la población periférica de células Treg $FoxP3^+$ (Fig. 2) (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). El hecho de que la generación de las nTreg en el timo responda a antígenos propios, mientras que la diferenciación de las iTreg en la periferia responda a antígenos ajenos como alérgenos, comida o microorganismos comensales, sugiere que probablemente estos dos subtipos celulares desempeñen funciones diferentes (Hsieh et al., 2006; Jordan et al., 2001; Kretschmer et al., 2005; Lathrop et al., 2011).

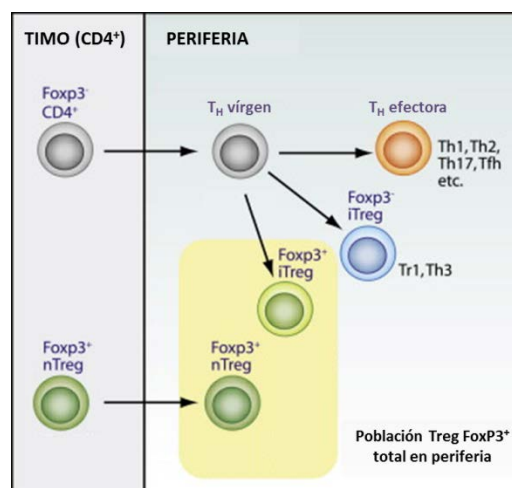


Figura 2. Desarrollo de células Treg FoxP3⁺. Las células Treg derivadas del timo o Treg naturales (nTreg) se generan en el timo y migran a los tejidos periféricos, mientras que las células Treg derivadas de la periferia o Treg inducibles (iTreg) se diferencian en los tejidos y órganos linfoides secundarios. Ambos tipos componen la población de células Treg FoxP3⁺. Figura modificada de Curotto de Lafaille et al., 2009 (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009).

Para la generación de nTreg, además de las señales a través del TCR para inducir la expresión de FoxP3, también es necesaria una combinación de las citoquinas IL-2, IL-17 e IL-15 (Fontenot et al., 2005; Vang et al., 2008). La diferenciación de las células Treg en el timo tiene lugar tras la señalización por TCR y la posterior expresión del receptor de IL-2 (CD25), que activa la vía del factor de transcripción Stat5, que tras dimerizar y traslocar al núcleo activa la transcripción de FoxP3 (Burchill et al., 2008; Lio and Hsieh, 2008).

Tanto el TGF- β como la IL-2 son necesarios para la diferenciación de los linfocitos iTreg (Davidson et al., 2007). En presencia de un alto gradiente de TGF- β , la IL-2 induce la expresión de FoxP3 a través de Stat5, promoviendo la proliferación y supervivencia de las iTreg y reprimiendo la diferenciación hacia T_H17 (Laurence et al., 2007).

3.3. Mecanismos de acción de los linfocitos T reguladores

Se han propuesto varios mecanismos mediante los cuales las Treg pueden desempeñar su función supresora. Pueden suprimir de forma directa la habilidad funcional de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ inhibiendo su diferenciación, activación y proliferación tanto por medio del contacto célula-célula como a través de la secreción de las citoquinas inhibitorias IL-10, TGF- β e IL-35 (Collison et al., 2007; Chen et al., 2003; Roncarolo et al., 2006). También pueden matar a las células T efectoras a través de perforinas y granzimas o suprimir su activación (Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004). Además, se ha descrito que las Treg expresan galectina-1, una beta-galactosidasa que participa en su capacidad supresora, ya que cuando se bloquea la unión de la galectina-1 se reducen significativamente los efectos inhibitorios de las Treg tanto en humano como en ratón (Garin et al., 2007).

Las Treg también podrían mediar su función supresora actuando directamente sobre las células dendríticas (DCs, *Dendritic Cells*), atenuando sus funciones como presentadoras de antígenos y coestimuladoras. Otros mecanismos de las Treg para limitar la respuesta inmune incluyen el papel de CTLA-4 en la inhibición de la expresión de IDO (indoleamina 2, 3-dioxigenasa) en las DCs (Mellor and Munn, 2004) o impidiendo la coestimulación de CD28 mediante la depleción extrínseca de sus ligandos (Qureshi et al., 2011).

4) El antígeno de activación leucocitario CD69

4.1. Localización y estructura de CD69

El gen *cd69* se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 de ratón y en el cromosoma 12 humano (López-Cabrera et al., 1993; Ziegler et al., 1994). Se encuentra dentro del “complejo génico NK”, denominado así porque en él se encuentran varios genes específicos de las células NKs (*Natural Killers*).

La proteína codificada por el gen *cd69* es un receptor transmembrana de tipo II perteneciente a la familia de lectinas tipo C, cuyo dominio de reconocimiento de carbohidratos (CTLD, *C-Type Lectin-like Domain*) se ha separado del original a lo largo de la evolución y recibe el nombre de NKD (*NK Domain*) por estar presente en muchos receptores específicos de células NKs (Weis et al., 1998). Este dominio ha perdido su capacidad para unir calcio y posiblemente carbohidratos (Weis et al., 1998; Llera et al., 2001). Además se ha demostrado que CD69 no se une a monosacáridos ni a varios polisacáridos, sólo mostrando una unión débil a los fucoidanos (polisacáridos sulfatados) (Childs et al., 1999). Aunque hasta hace poco no se conocían sus ligandos naturales, recientemente se han descrito dos importantes ligandos de CD69. Por un lado, se ha visto que la galectina-1 presente en las células dendríticas es un ligando de CD69 y que la unión entre ambos modula la diferenciación y función de las células T_H17 (de la Fuente et al., 2014). Y por otro lado, se ha publicado que el complejo S100A8/S100A9 presente en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) es un ligando de CD69 necesario para que CD69 pueda ejercer su función en la diferenciación de las células Treg. La unión CD69-S100A8/S100A9 regula la expresión de SOCS3 inhibiendo la vía de señalización de STAT3, al mismo tiempo que podría aumentar la secreción de TGF- β reduciendo la producción de la citoquina IL-4 en las PBMCs (Lin et al., 2015).

La estructura de CD69 consiste en un dominio extracelular CTLD y una región citoplásmica N-terminal fosforilada constitutivamente en residuos de serina, enlazados por una región cuello transmembrana (Lanier et al., 1988; Testi et al., 1988). La caracterización bioquímica de esta molécula demostró que se trata de una glicoproteína homodimérica de aproximadamente 60 kDa formada por dos cadenas polipeptídicas idénticas pero con distinta glicosilación (de 33 a 27 kDa) unidas mediante puentes disulfuro (Sánchez-Mateos y Sánchez-Madrid, 1991).

La expresión de la molécula de CD69 durante la activación del linfocito T requiere su síntesis *de novo* (Cebrián et al., 1988), que puede ser inducida *in vitro* por una gran variedad de estímulos como el tratamiento con anticuerpos monoclonales (mAb, *monoclonal Antibodies*) frente a CD3/TCR o a CD2, agentes activadores de la proteína quinasa C (PKC, *Protein Kinase*

C), como los ésteres de forbol, o el tratamiento con lectinas mitogénicas como la fitohemaglutinina (PHA, *Phytohemagglutinin*) (Hara et al., 1986; Cebrián et al., 1988). También se ha descrito la inducción de CD69 en linfocitos T CD4⁺ de manera independiente de antígeno mediante combinaciones de citoquinas como la IL-2, el factor de necrosis tumoral (TNF, *Tumor Necrosis Factor*) y la IL-6 (Unutmaz et al., 1994). La citoquina IL-15 aumenta la expresión de CD69 en células T y células NKs (Kanegane y Tosato, 1996; McInnes et al., 1997).

En cuanto al mecanismo molecular, la mayoría de los estímulos descritos para la inducción de la expresión de CD69 implican la activación de la PKC (Cebrián et al., 1988). De manera parcialmente independiente a esta vía se ha descrito la implicación de las proteínas Ras y su efector Raf-1 en la inducción de CD69 dependiente de TCR-CD3 (D'Ambrosio et al., 1994) (Taylor-Fishwick y Siegel, 1995). La unión de CD69 a anticuerpos monoclonales anti-CD69 en presencia de ésteres de forbol induce un flujo de calcio en la célula que provoca la activación de ERK, la expresión de los genes de IL-2 e IFN- γ y la proliferación de las células T (Testi et al., 1989; Zingoni et al., 2000). Recientemente, estudios realizados en nuestro grupo han demostrado que la expresión de CD69 inhibe la diferenciación de las células T_H17 a través de la activación de la vía de señalización Jak3/Stat5 tanto en humano como en ratón (Martin et al., 2010a). La cola citoplasmática de CD69 se asocia con la vía de señalización Jak3/Stat5 activándola e inhibiendo la transcripción de ROR γ t y, en consecuencia, la diferenciación hacia el linaje T_H17 (Fig. 3). Experimentos funcionales en células T_H17 han demostrado que la inhibición selectiva de la activación de Jak3/Stat5 aumenta la transcripción de ROR γ t, mientras que la IL-2 exógena que restablece la fosforilación de Stat5, limita la diferenciación en células T_H17 de las células deficientes en CD69 (Martin et al., 2010a).

Respecto a la regulación de la expresión del gen de CD69, el análisis de la secuencia 5' flanqueante al gen reveló la presencia de un elemento TATA potencial 30 bases antes del sitio de inicio de la transcripción y varias secuencias de unión putativas para factores de transcripción inducibles (NK- κ B, Egr-1, AP-1) que mediarían de esta manera la expresión regulada de este gen (López-Cabrera et al., 1995). Así, la modulación del promotor de CD69 por citoquinas proinflamatorias como TNF depende de la transactivación por NK- κ B (López-Cabrera et al., 1995). Otros estímulos como los ésteres de forbol o la estimulación por la vía del TCR inducen múltiples factores de transcripción como las familias AP-1, EGR y ATF/CREB, que actúan en cis para regular el promotor de CD69 (Castellanos et al., 1997; Castellanos et al., 2002).

4.2. Expresión *in vivo* de CD69

El antígeno de activación leucocitaria CD69 se induce en todas las células derivadas de la médula ósea, excepto en los eritrocitos, tras la activación celular (Testi et al., 1994). Su rápida

expresión en la membrana (entre 2 y 4 horas tras la activación de las células) sitúan a CD69 dentro del grupo de genes tempranos inducidos durante la activación linfocitaria (Lopez-Cabrera et al., 1993). Su expresión *in vivo* se restringe a los timocitos seleccionados positivamente y a los leucocitos activados, especialmente en los sitios de inflamación (Barthlott et al., 1997; Sanchez-Mateos et al., 1989; Swat et al., 1993). De hecho CD69 se expresa intensa y persistentemente en los infiltrados celulares en enfermedades inflamatorias crónicas severas, tales como la artritis reumatoide (Laffon et al., 1991) o la hepatitis viral crónica (Garcia-Monzon et al., 1990), así como en los leucocitos involucrados en la respuesta alérgica (Hartnell et al., 1993). CD69 también se expresa en los leucocitos responsables del rechazo de trasplantes (Mampaso et al., 1993), en linfocitos que infiltran tumores (Coventry et al., 1996), en células inmunitarias en las lesiones ateroscleróticas (Caspar-Bauguil et al., 1998) y en infecciones persistentes (Zajac et al., 1998).

En tejidos normales, CD69 está presente en células B del manto de los ganglios linfáticos y en células T CD4⁺ de los centros germinales (Sanchez-Mateos et al., 1989). Además, se ha detectado su expresión en un pequeño grupo de timocitos medulares (Sanchez-Mateos et al., 1989), plaquetas (Testi et al., 1990), neutrófilos (Gavioli et al., 1992), eosinófilos (Nishikawa et al., 1992), basófilos (Escribano et al., 1997), células de Langerhans (Bieber et al., 1992) y monocitos periféricos (De Maria et al., 1994).

La expresión de CD69 en los timocitos durante la selección positiva se ha relacionado con el proceso de activación que ocurre durante el desarrollo tímico, ya que las señales generadas por el receptor de la célula T son capaces de inducir la expresión de CD69 sólo tras el proceso de selección positiva. Teniendo en cuenta este patrón de expresión restringido a los timocitos, se ha propuesto que CD69 quizá desempeñe una función importante en los estadios tardíos del desarrollo tímico (Swat et al., 1993; Vanhecke et al., 1995).

4.3. Papel inmunoregulador de CD69

En los últimos años varios estudios en modelos de inflamación han puesto de manifiesto el papel de CD69 como regulador negativo de la inflamación durante la respuesta inmune. La primera evidencia de esta función inmunoreguladora se obtuvo en un modelo de artritis inducida por colágeno (*CIA*, *Collagen-Induced Arthritis*) en el que se observó que ratones deficientes en CD69 desarrollaban formas exacerbadas de la enfermedad. Los ratones CD69KO presentaban niveles bajos de TGF- β en las articulaciones, citoquina antiinflamatoria en los sitios de inflamación (Brandes et al., 1991), lo que indica que CD69 podría estar regulando la inflamación mediante la modulación de los niveles de TGF- β (Sancho et al., 2003).

Trabajos posteriores en modelos de inflamación con ratones deficientes en CD69 han proporcionado otras evidencias que apuntan en la misma dirección. La deficiencia de CD69 también exacerba la respuesta inflamatoria en los modelos animales de asma alérgico, dermatitis por contacto, miocarditis autoinmune y colitis. En los modelos de asma alérgico inducido con ovoalbúmina y de hipersensibilidad por contacto a oxazolona (CHS, *Contact Hypersensitivity*), la delección de CD69 o la administración de anticuerpos bloqueantes anti-CD69 incrementa la inflamación mediada por las células T efectoras en los pulmones y en la piel respectivamente, y aumenta la susceptibilidad de los ratones a desarrollar la enfermedad (Martin et al., 2010b). En el modelo de miocarditis experimental autoinmune (EAM, *Experimental Autoimmune Myocarditis*) inducido mediante la inmunización con péptidos derivados de la cadena pesada de la α -miosina cardiaca, los ratones deficientes en CD69 muestran una mayor respuesta mediada por las células T_H17 en el corazón, más inflamación en el miocardio y mayor susceptibilidad a sufrir un fallo cardíaco como consecuencia de la progresión de la cardiomiopatía que los ratones WT (Cruz-Adalia et al., 2010). En el modelo de colitis, la deficiencia en CD69 aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias, reduce la inducción de las células T reguladoras $Foxp3^+$ impidiendo la tolerancia oral y aumenta la severidad de la colitis (Radulovic et al., 2012). CD69 actúa como un regulador negativo de la respuesta inflamatoria en el intestino disminuyendo también la expresión de quimioquinas y reduciendo la acumulación de células T $CD4^+$ en la lámina propia del colon durante la colitis (Radulovic et al., 2013).

Como hemos visto, estudios moleculares han demostrado que CD69 inhibe la diferenciación de las células T_H17 a través de la activación de la vía de señalización Jak3/Stat5 tanto en humano como en ratón (Martin et al., 2010a). Además, CD69 también induce la expresión de los genes que codifican para la IL-2 y el TGF- β , citoquinas que actúan de forma autocrina en la inducción de la diferenciación de las células Treg. Por otro lado, CD69 puede inhibir la diferenciación hacia el linaje T_H17 porque la activación de Stat5 inhibe la fosforilación de Stat3 y su traslocación al núcleo, impidiendo la transcripción de ROR γ_t , el factor de transcripción necesario para la generación de las células T_H17 (Harris et al., 2007; Ivanov et al., 2006; Yang et al., 2007); y porque además la activación de FoxP3 inhibe la transcripción de ROR γ_t . Así, CD69 funciona como un modulador negativo de las respuestas inmunes mediadas por células T regulando el balance entre los linfocitos T reguladores y los T_H17 , así como entre las citoquinas pro- y anti-inflamatorias, tanto en la homeostasis como en la inflamación (Martin and Sanchez-Madrid, 2011) (Fig. 3).

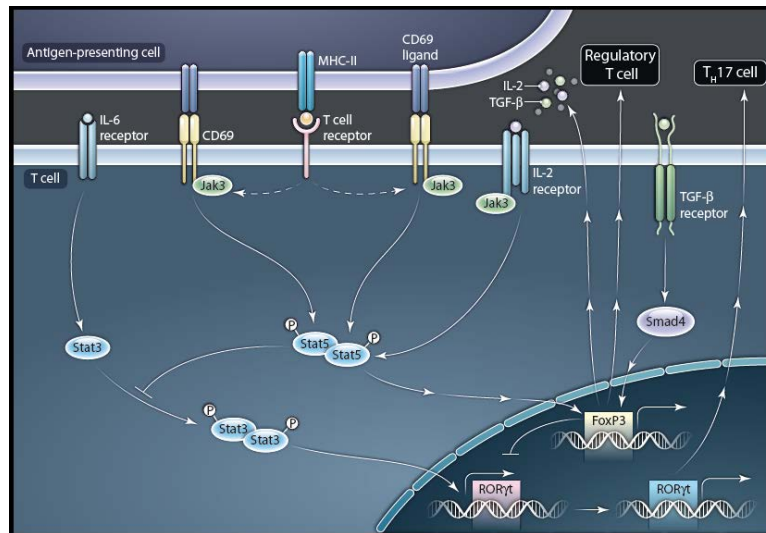


Figura 3. La abundancia de CD69 en los linfocitos T puede regular el balance entre las células T_H17 y las T reguladoras tanto en homeostasis como en la inflamación. La cola citoplasmática de CD69 se asocia con Jak3/Stat5, desencadenando la fosforilación de Stat5 y su traslocación al núcleo, donde activa a FoxP3 y estimula la diferenciación de las células Treg. CD69 también induce la expresión de los genes que codifican para la IL-2 y el TGF-β, citoquinas que actúan de forma autocrina en la inducción de la diferenciación de las células Treg. Por otro lado, CD69 puede inhibir la diferenciación hacia el linaje T_H17 porque la activación de Stat5 inhibe la fosforilación de Stat3, impidiendo la transcripción de RORγt; y porque además la activación de FoxP3 inhibe la transcripción de RORγt. Figura tomada de Martin et al., 2011 (Martin and Sanchez-Madrid, 2011).

Existen otras evidencias que apoyan una función reguladora de CD69 en la respuesta inmune consistentes en la identificación de poblaciones de linfocitos T $CD69^+$ que parecen poseer las dos principales características de las células Treg: comportamiento anérgico y efectos reguladores. Por ejemplo, en los tejidos linfoides periféricos y en los infiltrados inflamatorios en un modelo de lupus en ratón se ha detectado una subpoblación de células $CD4^+ CD69^+$ anérgicas capaces de suprimir la síntesis de IL-2 por parte de las células $CD4^+ CD69^-$, lo que favorece la diferenciación de las células T_H17 e inhibe la generación de los linfocitos T reguladores (Ishikawa et al., 1998). Un estudio clínico realizado con pacientes de esclerosis sistémica ha revelado que la expresión de CD69 en las células T reguladoras de estos pacientes es menor y que esta expresión disminuida se correlaciona con un defecto en la síntesis de TGF-β y con una reducción en la capacidad supresora de las células Treg (Radstake et al., 2009).

Recientemente se ha identificado en ratón una nueva subpoblación de linfocitos T reguladores $CD69^+ CD4^+ CD25^-$ inducida en respuesta a tumores que no expresan FoxP3 ni sintetizan IL-10, pero que expresan CD122 (la cadena β del receptor de la IL-2) y TGF-β1 unido a la membrana (Han et al., 2009). Estas células T reguladoras que aumentan dramáticamente con la progresión

del tumor, son capaces de suprimir la proliferación de las células T a través de TGF- β 1. CD69 participa en la actividad inmunosupresora de estas células Treg, ya que mantiene alta la expresión de TGF- β 1 mediante la activación de ERK1/2 (Han et al., 2009). Estas células T reguladoras CD69⁺ CD4⁺ CD25⁻ se han encontrado en pacientes y se ha visto que su incidencia está asociada a un menor riesgo de sufrir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, *Graft-Versus-Host-Disease*) tras un alotransplante (Lu et al., 2012). Más recientemente se ha demostrado que las células T CD69⁺ derivadas de tumores inducen un aumento en la expresión de IDO en monocitos, lo que constituye un potencial mecanismo de regulación negativa entre las células inmunes innatas y adaptativas, que puede contribuir a la evasión de la vigilancia inmunológica por parte de las células tumorales (Zhao et al., 2012).

Nuestro grupo también ha investigado el papel de CD69 en la función supresora de las Treg y en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, identificando una nueva población de células Treg FoxP3⁺CD69⁺ capaz de mantener la tolerancia y proteger de la inflamación (Cortes et al., 2014). Aunque en homeostasis existen Tregs tanto CD69⁺ como CD69⁻FoxP3⁺, sólo las Tregs CD69⁺ expresan altos niveles de CTLA-4, ICOS, CD38 y marcadores de supresión asociados a GITR, secretan grandes cantidades de TGF- β y poseen una potente capacidad supresora. Esta capacidad está regulada por las vías de señalización de STAT5 y ERK y se ve afectada cuando se reduce la expresión de CD69 mediante el uso de anticuerpos. Además, la inmunoterapia con Treg FoxP3⁺CD69⁺ restaura la homeostasis en ratones CD69^{-/-} que no lograban inducir tolerancia y es capaz de prevenir la inflamación. La identificación de la población de Treg FoxP3⁺CD69⁺ allana el camino hacia el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas capaces de controlar la homeostasis inmune y la autoinmunidad (Cortes et al., 2014).

Además, CD69 se ha asociado con el desarrollo de las células T reguladoras naturales (nTreg) en el timo humano. Cuando son activadas, las células dendríticas plasmacitoides residentes en el timo promueven la generación de células Treg CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ a partir de timocitos CD4⁺ CD8⁺ que expresan altos niveles de CD69 (Martin-Gayo et al., 2010).

Por último, varios estudios *in vivo* muestran un papel de CD69 en la migración de las células inmunes a través de la regulación del receptor de la esfingosina 1-fosfato 1 (S1P₁, *Sphingosine-1-phosphate receptor 1*), una molécula que controla la salida de los linfocitos de los tejidos linfoides (Shiow et al., 2006). CD69 puede formar un complejo con S1P₁ en la membrana de los linfocitos T e inducir una conformación de S1P₁ que favorece su internalización y degradación, lo que provoca la retención de los linfocitos en los órganos linfoides (Bankovich et al., 2010; Shiow et al., 2006). Por ello, la ausencia de CD69 está asociada con un incremento en la

expresión de S1P₁ y en consecuencia, con una mayor migración de los linfocitos T a los nódulos linfáticos o a los sitios de inflamación (Rivera et al., 2008). Así, la deficiencia en CD69 facilita indirectamente la infiltración de células inflamatorias en los tejidos. Además, S1P₁ también media la migración de las células dendríticas maduras de la periferia a los nódulos linfáticos (Czeloth et al., 2005) y la migración de estas células también se ve incrementada significativamente en ratones deficientes en CD69 tanto *in vitro* como *in vivo* (Lamana et al., 2011); otra evidencia de su función como regulador negativo en la migración dirigida por quimioatrayentes.

5) Los microRNAs

Un microRNA (miRNA) es una molécula de RNA no codificante de entre 20 y 24 nucleótidos de longitud que regula post-transcripcionalmente la expresión de otros genes mediante su unión a la región 3'-UTR (*untranslated region*) de RNAs mensajeros (mRNA) específicos, impidiendo la traducción del mRNA o provocando su degradación (Pillai, 2005). Los miRNAs fueron descritos por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans* en 1993 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993), aunque el término microRNA no se acuñó hasta 2001 (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Desde el descubrimiento de esta nueva categoría de RNAs pequeños, los crecientes estudios ya han permitido identificar 30424 miRNAs maduros en 206 especies (base de datos miRBase, edición 20, junio 2013). Además, se estima que un solo miRNA puede regular la expresión de entre cientos y miles genes diana, lo que significa que posiblemente la mayor parte de los genes humanos estén regulados por miRNAs (Griffiths-Jones, 2004; Lewis et al., 2005; Miranda et al., 2006). De hecho, se ha visto que los miRNAs regulan numerosos procesos biológicos tales como la respuesta inmune, el ciclo celular, el metabolismo, la replicación viral, la diferenciación de las células madre o el desarrollo embrionario; y se ha encontrado alterada su expresión o función en muchas enfermedades como el cáncer, el fallo cardíaco o en infecciones virales. En concreto, se han identificado hasta la fecha más de 100 miRNAs que pueden regular distintas rutas moleculares que controlan el desarrollo y la función de las células del sistema inmune innato y adaptativo (O'Connell et al., 2012).

5.1. Biogénesis de los microRNAs

Los miRNAs se encuentran codificados en el genoma tanto en genes independientes, como en los intrones de genes que codifican para proteínas. La RNA polimerasa II transcribe el DNA en unos transcritos primarios de RNA llamados pri-miRNAs. Los pri-miRNAs se pliegan sobre sí mismos en forma de horquilla y sufren un procesamiento secuencial por dos endonucleasas RNaseIII, llamadas Drosha y Dicer. En primer lugar, Drosha corta el transcrito en el núcleo

celular generando un pre-miRNA de unos 70 nucleótidos de longitud. A continuación, el pre-miRNA es exportado al citoplasma, donde Dicer lo procesa en un dúplex de RNA de 20-25 pares de bases compuesto por una cadena de miRNA maduro y su cadena complementaria o pasajera. Finalmente, la cadena pasajera es degradada y el miRNA maduro se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC, *miRNA-induced silencing complex*) para poder unirse a la región UTR 3' de sus mRNAs diana por complementariedad de bases parcial e inducir su degradación o bloquear su traducción (Krol et al., 2010; van Kouwenhove et al., 2011; Yang and Lai, 2011). Pero también existen evidencias de que los miRNAs pueden aumentar la traducción de los mRNAs diana (Vasudevan et al., 2007) u obstaculizar la transcripción de un mensajero uniéndose directamente a su promotor (Kim et al., 2008).

En 2008 se descubrió que los miRNAs también están presentes en la sangre, tanto en el plasma como en los leucocitos, eritrocitos y plaquetas (Chen et al., 2008; Lawrie et al., 2008; Mitchell et al., 2008). Los miRNAs presentes en el plasma son extraordinariamente estables incluso bajo condiciones tan duras como la ebullición, un pH alto o bajo, el almacenamiento a temperatura ambiente durante largos períodos o múltiples ciclos de congelación y descongelación (Chen et al., 2008; Mitchell et al., 2008). Esto se debe a que los miRNAs presentes en el plasma sanguíneo se encuentran empaquetados en vesículas extracelulares (exosomas, ectosomas o cuerpos apoptóticos) (Valadi et al., 2007; Zernecke et al., 2009) o asociados a proteínas de unión a RNA (Argonauta2) (Arroyo et al., 2011) o lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*) (Vickers et al., 2011) que evitan su degradación. La secreción de miRNAs en vesículas extracelulares ha resultado ser una novedosa forma de comunicación intercelular, en la que una célula secreta de manera selectiva un miRNA para que viaje hasta una célula diana y regule su expresión génica (Zernecke et al., 2009; Zhang et al., 2010b). Por ejemplo, las células T transfieren miRNAs a las células presentadoras de antígenos a través de exosomas CD63⁺ durante la sinapsis inmune para modular su expresión génica (Mittelbrunn et al., 2011).

5.2. Función reguladora de los microRNAs

La actividad reguladora de los miRNAs sobre los mRNAs diana está determinada por la complementariedad entre las secuencias de nucleótidos, sin embargo, el reducido tamaño de los miRNAs proporciona una secuencia relativamente limitada para definir la especificidad de la diana. En las plantas, los miRNAs suelen aparearse con sus dianas mediante una complementariedad exhaustiva. En cambio, en los animales son poco corrientes los alineamientos casi perfectos entre un miRNA y su mRNA diana, siendo muy común encontrar hibridaciones imperfectas que contienen interacciones parciales y salientes centrales de entre 9 y 12 nucleótidos desemparejados (Voinnet, 2009).

El rasgo primordial que determina que un miRNA interaccione con su mRNA diana se encuentra en su extremo 5', concretamente en el segmento comprendido entre las bases 2 y 7 de la molécula, llamado secuencia de reconocimiento o secuencia semilla (*seed sequence*). El extremo 5' está especialmente conservado entre miRNAs relacionados en su origen genómico y permite su clasificación en familias (Lim et al., 2003a; Lim et al., 2003b). Se ha propuesto que la hibridación imperfecta de la región 5' de un miRNA puede ser compensada en algunos casos mediante interacciones a través de su extremo 3' (Pasquinelli, 2012). Pero estas características de los miRNAs no son lo suficientemente rigurosas como para poder predecir exactamente sus dianas sólo en función de la complementariedad de secuencias. Por eso se han desarrollado numerosos algoritmos y herramientas que incorporan criterios basados tanto en la complementariedad de bases como en la conservación evolutiva. Estos análisis estiman que un solo miRNA puede regular la expresión de varios cientos de genes. Sin embargo, la divergencia entre predicciones obtenidas con distintos algoritmos dificulta la identificación de las dianas funcionales (Bartel, 2009).

6) El supresor de señalización de citoquinas 1 (SOCS1)

Las citoquinas regulan el desarrollo, la diferenciación y la función de las células hematopoyéticas mediante la transducción de señales de activación celular a través de receptores específicos asociados a tirosina quinasas intracelulares de la familia Janus (JAKs). La unión de una citoquina a su receptor produce la oligomerización del receptor y la fosforilación de las proteínas JAKs. Las JAKs activadas fosforilan y dimerizan a los factores de transcripción STATs, los cuales translocan al núcleo e inducen la transcripción de los genes SOCS entre otros (Yoshimura et al., 2012). Los supresores de señalización de citoquinas (SOCS, *Suppressors Of Cytokine Signaling*) constituyen uno de los principales mecanismos de regulación de esta vía, ya que son capaces de inhibirla mediante distintos mecanismos (Kubo et al., 2003; Palmer and Restifo, 2009; Yoshimura et al., 2007).

SOCS1 es uno de los miembros de esta familia más importantes en la regulación de las respuestas inmunes innata y adaptativa (Yoshimura et al., 2012). Se ha descrito que SOCS1 es un regulador esencial de la diferenciación de las células T, que promueve la diferenciación hacia el linaje T_H17 e inhibe la diferenciación hacia T_H1 y T_H2 (Tanaka et al., 2008). Como resultado, los ratones con células T deficientes en SOCS1 desarrollan enfermedades inflamatorias autoinmunes (Takahashi et al., 2011) y son más susceptibles a padecer colitis inducida por dextrán sulfato sódico (Horino et al., 2008) y hepatitis inducida por concanavalina A (enfermedad mediada por células T_H1) (Hashimoto et al., 2011), pero son más resistentes a enfermedades mediadas por células T_H17 como la encefalomiелitis experimental autoinmune

(Tanaka et al., 2008). Sin embargo, los trabajos posteriores al estudio de Tanaka *et al.* contradicen los datos referentes al efecto de SOCS1 en las células T_H17, ya que todos ellos sostienen que SOCS1 no promueve la diferenciación de las células T_H17 sino que la inhibe (Jager et al., 2011; Liu and Rohowsky-Kochan, 2011; Takahashi et al., 2011; Yao et al., 2012).

SOCS1 también juega un papel importante en la diferenciación y función de las células T reguladoras, inhibiendo su diferenciación y expansión pero favoreciendo su funcionalidad y estabilidad (Yoshimura et al., 2012). Los ratones con células T deficientes en SOCS1 presentan un incremento en el número de células Treg en timo y bazo (Lu et al., 2009; Zhan et al., 2009). Durante la diferenciación tímica, el aumento de expresión de FoxP3 incrementa la expresión de miR155, el cual inhibe la expresión de SOCS1 promoviendo la expansión de las Treg (Lu et al., 2009). SOCS1 mantiene la capacidad supresora de las Treg y su estatus celular impidiendo la pérdida de la expresión de FoxP3, lo que evita que se conviertan en células patogénicas secretoras de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ e IL-17 (T_H1 y T_H17) (Lu et al., 2010). Otro trabajo reciente muestra que SOCS1 inhibe la diferenciación tanto de las células T reguladoras como de las T_H17 e impide la función celular de las T_H17; y que miR-155 disminuye la expresión de SOCS1, lo que incrementa la fosforilación de Stat5 y Stat3, favoreciendo la diferenciación de las células Treg y T_H17 y aumentando la función de las T_H17 (Yao et al., 2012).

7) El receptor de aril-hidrocarburos (AHR)

El receptor de aril-hidrocarburos (AHR, *Aryl Hydrocarbon Receptor*) es un factor de transcripción que se activa tras su unión a una gran variedad de ligandos sintéticos y naturales (Nguyen and Bradfield, 2008). La forma inactiva del AHR se localiza en el citoplasma formando parte de un complejo proteico que incluye a la proteína de choque térmico hsp90 y a la tirosina quinasa c-SRC (Soshilov and Denison, 2011). Tras la unión de un ligando, el AHR se disocia de su complejo, se transloca al núcleo e interacciona con secuencias específicas de los genes dianas para controlar su actividad transcripcional (Soshilov and Denison, 2011). Para llevar a cabo este control de la transcripción, el AHR establece interacciones proteína-proteína con coactivadores y otros factores de transcripción, tales como los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs, *Signal Transducers and Activators of Transcription*), el receptor del ácido retinoico (RA, *Retinoic Acid*), el receptor de estrógeno (ER, *Estrogen Receptor*) y el factor nuclear κ B (NF- κ B) (Hankinson, 2005). Así, la señalización a través del AHR juega un papel importante en el control de varios componentes del sistema inmunológico incluyendo las células T, las células B y el sistema inmune innato (Quintana, 2013). Llamativamente, varias de estas interacciones proteicas entre el AHR y otros factores de

transcripción se establecen sólo tras la activación del AHR con determinados ligandos (Boronat et al., 2007; Murray et al., 2010; Zhang et al., 2008b). Un ejemplo de este reclutamiento de factores transcripcionales específico de ligando es el caso de las células T reguladoras y de las células T_H17, en las que el AHR regula su diferenciación de manera distinta dependiendo del ligando unido (Quintana et al., 2008) (Fig. 4).

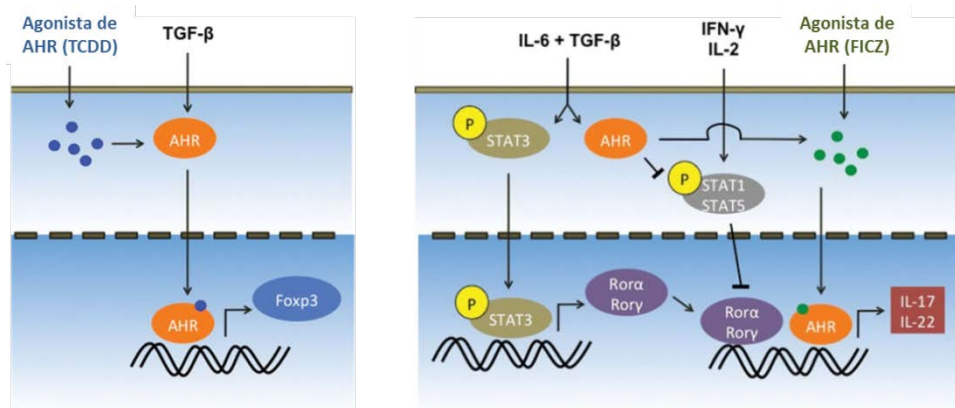


Figura 4. Regulación del programa transcripcional de las células Treg y T_H17 por el AHR. La unión del AHR con ligandos específicos promueve y estabiliza el programa transcripcional de las células que lo expresan. La activación del AHR por la TCDD en las células Treg promueve su expansión, ya que el AHR se une al promotor de FoxP3 promoviendo la diferenciación de las células Treg (izquierda). Sin embargo, la activación del AHR con FICZ promueve la expresión de IL-17, IL-21 e IL-22 y limita los efectos inhibitorios de IFN γ e IL-2 en la diferenciación de las células T_H17, ya que el AHR impide la fosforilación de Stat-1 y Stat-5 (derecha). Figura modificada a partir del modelo que aparece en Nguyen et al., 2013 (Nguyen et al., 2013).

Por un lado, la activación del AHR por la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) induce la diferenciación de Treg, las cuales suprimen el desarrollo de la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) mediante un mecanismo dependiente de TGF- β 1 (Quintana et al., 2008), la uveoretinitis autoinmune experimental (Zhang et al., 2010a), la colitis (Benson and Shepherd, 2011; Singh et al., 2011) y la diabetes autoinmune espontánea (Kerkvliet et al., 2009). La expansión de las células Treg por la activación del AHR involucra varios mecanismos, incluidos la trans-activación directa de la expresión de FoxP3 (Quintana et al., 2008), la inhibición de la señalización de Stat-1 (Quintana et al., 2010) y los cambios epigenéticos en el locus FoxP3 (Singh et al., 2011). Aunque la TCDD es una valiosa herramienta para investigar los efectos inmunológicos de la activación del AHR, la TCDD no es un ligando natural del AHR y sus propiedades tóxicas descartan su uso para tratar desórdenes autoinmunes en humanos (Quintana, 2013). Afortunadamente, se ha corroborado el papel fisiológico del AHR en las células Treg con ligandos no tóxicos como un ligando endógeno derivado del triptófano presente en la mucosa, el

éster metílico del ácido 2-(1'-indol-3-carbonil)-tiazol-4-carboxílico (ITE). La administración de ITE expande las células Treg y trata la EAE (Quintana et al., 2010). De la misma forma, la deficiencia o inhibición del AHR disminuye la diferenciación de las células Treg (Kimura et al., 2008; Mezrich et al., 2010; Quintana et al., 2008; Quintana et al., 2010).

Por el otro lado, la activación del AHR con 6-formylindolo [3,2-b] carbazol (FICZ) obstaculiza la generación de Treg y estimula la diferenciación de las células T_H17, lo que agrava la autoinmunidad en el sistema nervioso central (Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). La expresión del AHR está aumentada en las células T_H17 (Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2008) probablemente porque el Stat-3 fosforilado transactiva de forma directa el promotor del AHR (Durant et al., 2010). A su vez, el factor de transcripción AHR controla la producción de IL-21 e IL-22 y juega un importante rol en la diferenciación de las células T_H17, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kimura et al., 2008; Li et al., 2011b; Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2009; Veldhoen et al., 2008). Los efectos del AHR en los linfocitos T_H17 podrían estar mediados a través de la inhibición de la fosforilación de Stat-1 y Stat-5, lo que atenuaría los efectos inhibitorios del interferón- γ y la IL-2 sobre la diferenciación de las células T_H17 (Kimura et al., 2008; Veldhoen et al., 2009). Además, se ha descrito recientemente que bajo condiciones polarizantes hacia T_H17, el AHR junto con Stat-3 promueven la expresión del factor de transcripción Aiolos, el cual silencia la transcripción del gen de la IL-2 promoviendo la diferenciación de las células T_H17 (Quintana et al., 2012).

Por último, se ha descrito recientemente un programa metabólico controlado por los factores de transcripción AHR y el factor-1 α inducible por hipoxia (HIF1- α) que apoya la diferenciación de las células T reguladoras tipo 1 (Tr1) (Mascanfroni et al., 2015). HIF1- α regula la reprogramación metabólica temprana de las células Tr1. A continuación, AHR promueve la degradación de HIF1- α y toma el control del metabolismo de las células Tr1. El ATP extracelular (eATP) y la hipoxia unidos a la inflamación, provocan la inactivación del AHR por HIF1- α e inhiben la diferenciación de las Tr1. Por el contrario, CD39 promueve la diferenciación de las células Tr1 por depleción del eATP. CD39 también contribuye a la actividad supresora de las Tr1 mediante la generación de adenosina en cooperación con el CD73 expresado por las células T respondedoras y las APCs. Estos resultados sugieren que HIF1- α y AHR integran señales inmunológicas, metabólicas y ambientales para regular la respuesta inmune (Mascanfroni et al., 2015).

8) La miocarditis y el modelo de miocarditis experimental autoinmune (EAM)

La inflamación del miocardio, miocarditis, es una enfermedad muy heterogénea que en la mayoría de los casos está asociada a agentes infecciosos como virus, bacterias, hongos o

protozoos (Andreoletti et al., 2009). Sin embargo existen evidencias de que esta enfermedad es de naturaleza autoinmune, por lo que los pacientes de miocarditis son tratados con terapias inmunosupresoras (Frustaci et al., 2003; Frustaci et al., 2009). El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la presencia de infiltrados mononucleares en el miocardio y en la necrosis de los cardiomiocitos, atendiendo al criterio de Dallas (Aretz et al., 1987; Basso et al., 2012; Elliott et al., 2008; Maron et al., 2006). En alrededor del 9-16% de los pacientes de miocarditis, la enfermedad degenera en una cardiomiopatía dilatada inflamatoria (DCM, *dilated cardiomyopathy*), caracterizada por una dilatación crónica de los ventrículos, con un grosor de la pared del ventrículo izquierdo normal o reducido, y una contracción cardíaca anormal (Felker et al., 2000; Herskowitz et al., 1993). La DCM es la principal causa de fallo cardíaco en individuos con edades inferiores a 40 años y el motivo más frecuente a la hora de realizar trasplantes de corazón. La tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con DCM es inferior al 50% (Magnani et al., 2006).

Se han generado diversos modelos animales para el estudio y caracterización de la patogénesis de la miocarditis. El modelo de miocarditis experimental autoinmune (EAM) se induce mediante la inmunización subcutánea de un péptido derivado de la cadena pesada de la miosina- α cardíaca (MyHC- α) emulsionado en el adyuvante CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) (Cihakova et al., 2004). El proceso del modelo de EAM puede dividirse en tres fases: el “priming” o primer estímulo (días 0-10) en el que las células presentadoras de antígenos captan el péptido inoculado y migran a los ganglios linfáticos drenantes, lo que provoca la activación de las células T vírgenes y su diferenciación en células T efectoras; la fase aguda (días 10-21) en la que las células T efectoras egresan de los ganglios y migran por el torrente sanguíneo hasta que localizan el antígeno en el miocardio y empiezan a desempeñar sus funciones efectoras secretando citoquinas; y la fase crónica (días 60-65) en la que la inflamación generada en el corazón provoca el desarrollo de una cardiomiopatía dilatada (Barin and Cihakova, 2013) (Fig. 5).

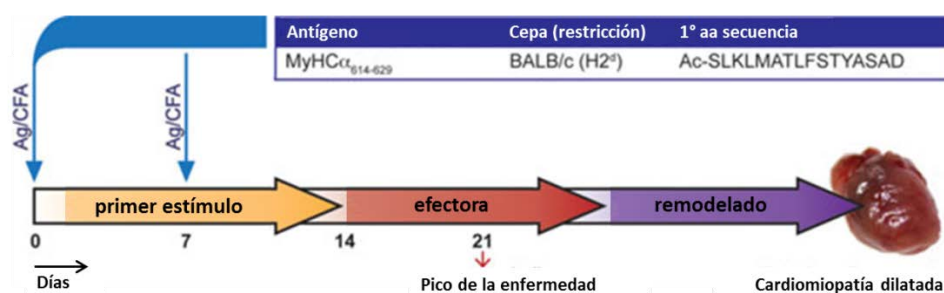


Figura 5. Representación esquemática del modelo de miocarditis experimental autoinmune (EAM). El protocolo de inducción de la EAM consiste en la inmunización subcutánea de un péptido derivado de la α -miosina cardíaca (MyHC α) emulsionado en el adyuvante CFA (*Complete Freund's Adjuvant*). El modelo se divide en tres fases: el “priming” o primer estímulo (días 0-10), en la que todavía no existe una inflamación cardíaca aparente, pero se están programando respuestas autoagresivas; la fase efectora (días 10-21), durante la que aparecen infiltrados leucocitarios en el miocardio y anticuerpos anti-miosina cardíaca en el suero; y la fase de remodelado (alrededor de los días 60-65), en la que la cardiomiopatía dilatada inflamatoria se ha desarrollado completamente. Figura modificada a partir del modelo que aparece en Barin et al., 2013 (Barin and Cihakova, 2013).

Los principales mediadores de la respuesta celular en la EAM son los linfocitos T_H17. Se ha demostrado que en este modelo las células T_H17 son más inmunopatológicas que las células T_H1 y que los ratones deficientes en T-bet, un factor de transcripción T-box esencial para la diferenciación de los linfocitos T_H1, desarrollan una forma severa de EAM en la que las células infiltrantes en el corazón secretan grandes cantidades de IL-17 (Rangachari et al., 2006). En el modelo de EAM, la IL-23 es la citoquina responsable de la inducción de la autoinmunidad cardíaca (Rangachari et al., 2006), mientras que la IL-17 es dispensable para la miocarditis pero esencial para la progresión de la cardiomiopatía dilatada (Baldeviano et al., 2010). Además, trabajos recientes en el laboratorio han demostrado que CD69 limita la severidad de la cardiomiopatía subsiguiente a la miocarditis autoinmune regulando negativamente la respuesta Th17, la inflamación cardíaca y la progresión del fallo cardíaco en el modelo de EAM (Cruz-Adalia et al., 2010).

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral han sido investigar:

1. El papel de CD69 en el desarrollo de las células nTregs y en la diferenciación y la función de las células iTregs.
2. La regulación de la expresión de miRNAs mediada por CD69 en los linfocitos CD4⁺ naive, T_H17 y Treg.
3. La expresión de las dianas predictivas de miR-721 y miR-155.
4. El papel de los miRNAs mediado por CD69 en el modelo animal de miocarditis experimental autoinmune.
5. Los linfocitos T_H17, células T reguladoras y la expresión de miRNAs en la sangre de pacientes con cardiomiopatías.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones

Los ratones deficientes en CD69 (CD69KO) fueron generados en fondo genético 129SV como se ha descrito previamente (Lauzurica et al., 2000) y cruzados en homocigosis durante más de 12 generaciones para obtenerlos en los background BALB/c y C57BL/6J. Para los experimentos de diferenciación *in vitro* y *ex vivo* se utilizaron ratones transgénicos C57BL/6 Tg(TcraTcrb)425Cbn/J (OT-II), caracterizados por expresar un TCR que reconoce específicamente el péptido 323-339 de la OVA en contexto de MHC-II (I-Ab) (Jackson, número de stock 004194). Estos ratones OTII se cruzaron con ratones CD69KO en fondo genético C57BL/6J para generar ratones CD69KO transgénicos para el TCR (OTKO). Todos los experimentos relacionados con el modelo de la miocarditis experimental autoinmune (EAM) se realizaron con ratones CD69KO y controles WT con fondo genético BALB/c. Los ratones han sido mantenidos en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) bajo condiciones específicas libres de patógenos. Todos los procedimientos que implican el uso de estos animales y sus cuidados fueron aprobados por el comité de ética del CNIC y la Dirección General de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, y fueron llevados a cabo según las directrices del real decreto 53/2013 y de la Unión Europea de Bienestar y Salud Animal.

2. Cultivos primarios

Las células de ratón se obtuvieron por disgregación mecánica de los bazo y los ganglios linfáticos de ratones OTII y OTKO. Las células T CD4⁺ naive fueron marcadas con los anticuerpos biotinilados IgM, B220, CD19, MHC class II (I-Ab), CD11b, CD11c, CD44, CD25, CD8 α y DX5, mientras que las células presentadoras de antígenos (APCs) se marcaron con los anticuerpos unidos a biotina CD3, CD4, Thy1.2, CD8 α y DX5. La purificación de subpoblaciones celulares se realizó por selección negativa en columnas imantadas, tras incubar con microesferas magnéticas conjugadas con estreptavidina (MACS, Miltenyi Biotec) capaces de unirse a los anticuerpos específicos biotinilados.

Para la diferenciación *in vitro* de linfocitos iTreg y T_H17, se irradiaron APCs con una dosis de 30 Gys, se incubaron con el péptido OVA 323-339 (10 μ g/ml) y se cultivaron con células T CD4⁺ naive en RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) con un 10% de suero fetal bovino y 50 μ M β -mercaptoetanol (Invitrogen). A estos cultivos se les añadió la combinación de citoquinas y anticuerpos (R&D Systems) necesaria para diferenciar cada tipo celular: IL-2 (10 ng/ml) y TGF- β (10 ng/ml) para diferenciarlas hacia células iTreg; o IL-6 (20 ng/ml), IL-23 (10 ng/ml), TGF- β (10 ng/ml), anti-IFN γ (4 μ g/ml) y anti-IL-4 (4 μ g/ml) para polarizarlas hacia el linaje T_H17.

Para la generación de células T_H17 y Treg *in vivo* se inmunizaron ratones BALB/c WT y CD69KO inyectándoles subcutáneamente 100 μ g/ratón de un péptido derivado de la cadena pesada de la miosina α (MyHC- α) específica de tejido cardíaco emulsionado con el adyuvante CFA (Complete Freund's Adjuvant) a día 0 y 7. El día 10 se aislaron las células Treg de los ganglios linfáticos que drenan la zona de la inyección, mediante separación magnética (depleción de células T $CD4^+$ y sucesiva selección positiva de células $CD25^+$), mientras que las células T_H17 fueron aisladas mediante sorting por citometría de flujo (Aria Cell Sorter, BD) tras reestimarlas con el péptido MyHC- α (10 μ g/ml) e IL-23 (10 ng/ml) durante 48 h. La pureza de estos tipos celulares tras el proceso de aislamiento fue analizada mediante citometría de flujo con los siguientes anticuerpos: anti-CD4, anti-CD25 y anti-FoxP3 para las células Treg; y anti-CD4 y anti-IL-17 para las células T_H17 .

3. Aislamiento de linfocitos de sangre periférica de ratón

En el modelo animal, los linfocitos de sangre periférica se aislaron de la sangre de ratones BALB/c WT y CD69KO por centrifugación en gradiente con Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). La sangre se diluyó con suero salino fisiológico heparinizado para evitar su coagulación, se depositó sobre Ficoll-Paque a temperatura ambiente, se centrifugó 20 minutos a 700g a 25° C sin freno y se recogió la fracción leucocitaria. A continuación se marcaron las células Treg sin activar o activadas con anti-CD3 (2 μ g/ml) y anti-CD28 (2 μ g/ml) durante 24 h a 37° C, con anticuerpos CD4, CD25, CD69 y FoxP3 y se analizaron por citometría de flujo. En el caso de los linfocitos T_H17 , las células fueron activadas con anti-CD3 (2 μ g/ml) y anti-CD28 (2 μ g/ml) durante 24 h a 37° C, reestimuladas con PMA (0,05 μ g/ml), ionomicina (0,75 μ g/ml) y brefeldina (1 μ l/ml) durante 4 horas y marcadas con anticuerpos CD4 e IL-17 para analizarlas por citometría de flujo.

4. Ensayos de proliferación celular

La capacidad de proliferación de las células iTreg diferenciadas *in vitro* se valoró mediante la técnica de incorporación de timidina tritiada. Para ello, el último día del cultivo celular, como se ha detallado anteriormente, se añadió el isótopo radioactivo timidina tritiada (T^3H) y se dejó en el medio durante las 16 horas siguientes. La radiactividad contenida en cada muestra, directamente proporcional a la síntesis de ADN, se cuantificó en un contador beta de centelleo líquido.

5. Ensayos de supresión

Los ensayos de supresión se llevaron a cabo co-cultivando células T convencionales ($CD4^+$ naive) en presencia de anti-CD3 y anti-CD28 con iTregs WT o CD69 KO diferenciadas *in vitro*

durante 3 días. La capacidad de proliferación de las células T convencionales en presencia de las iTreg fue analizada mediante la incorporación de timidina tritiada (añadida al medio en las últimas 16 h del cultivo) o mediante citometría de flujo, marcando previamente las células T convencionales con la sonda CellTrace Violet (Invitrogen). El CellTrace Violet es un colorante que contiene un éster capaz de difundir en la membrana citoplasmática y, una vez en el interior de las células, unirse covalentemente a los grupos amina de las proteínas dando lugar a una molécula fluorescente. En cada división celular, la sonda se diluye a la mitad entre las 2 células hijas, por lo que el análisis de la intensidad de la fluorescencia por citometría de flujo permite determinar el número de divisiones llevadas a cabo por cada célula desde que fueron marcadas con dicha sonda.

6. Cultivos organotípicos de timos fetales (FTOCs)

Se extrajeron los timos de embriones de 16'5 días de gestación de ratones OTII y OTKO. Los timos embrionarios se cultivaron en flotación para permitir la oxigenación de los tejidos. Para ello se cultivaron a 37° C en IMDM al 5% en suero fetal bovino sobre filtros de 0.8 µm (Millipore) apoyados sobre discos flotantes de gomaespuma embebidos en el medio de cultivo. En los experimentos en los que los FTOC fueron tratados con anticuerpos 2.2 y 2.8, éstos estuvieron presentes en el medio a una concentración de 50 µg/ml durante todo el cultivo. En los días 5, 7, 10 y 15 de cultivo se disgregaron los lóbulos y se marcaron las células con anticuerpos CD4, CD8, CD69, CD25 y FoxP3 para analizar la generación de células nTreg por citometría de flujo.

7. Cuantificación de citoquinas secretadas

Para cuantificar la producción de citoquinas por las células iTregs OTII y OTKO diferenciadas *in vitro*, éstas fueron re-estimuladas durante 4 horas a 37° C con PMA (0,05 µg/ml) e ionomicina (0,75 µg/ml). La concentración de las citoquinas TGF-β, IL-2 e IL-10 secretadas al medio de cultivo fue analizada por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (R&D Systems).

8. Pacientes y voluntarios sanos

Los pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica, cardiomiopatía de takotsubo o Chagas fueron reclutados por el doctor Jesús Jiménez Borreguero en el Hospital de La Princesa. Tanto los pacientes como los voluntarios sanos que participaron en este estudio, fueron examinados mediante un ecocardiograma transtorácico para confirmar su estatus clínico (sanos o enfermos). Tras realizarse las pruebas diagnósticas de imagen, se extrajeron 4 ml de sangre periférica en tubo de EDTA para analizar las poblaciones de linfocitos CD4⁺ totales, T_H17 y Treg circulantes,

así como los niveles de expresión de miRNAs en el plasma sanguíneo de los donantes. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética del Hospital de La Princesa. Todos los participantes de este estudio firmaron el consentimiento informado tras ser informados detalladamente sobre los objetivos del estudio, los procedimientos empleados, los posibles beneficios y riesgos que éste conlleva y sobre la política de confidencialidad de sus datos personales.

9. Aislamiento de linfocitos de sangre periférica de pacientes

Los linfocitos de sangre periférica de los donantes voluntarios sanos y los pacientes con distintas cardiomiopatías se aislaron de la sangre por centrifugación en gradiente con Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). La sangre se diluyó con suero salino fisiológico (1:1), se depositó sobre Ficoll-Paque a temperatura ambiente, se centrifugó 20 minutos a 2.300 rpm a 25° C sin freno y se recogió la fracción que contenía los linfocitos, los monocitos y las plaquetas. A continuación se marcaron las células Treg sin activar o activadas con anti-OKT3 (10 µg/ml) durante 24 h, con anticuerpos CD4, CD25, CD69, CD45RA, CD45RO y FoxP3 y se analizaron por citometría de flujo. En el caso de los linfocitos T_H17, las células fueron activadas con anti-OKT3 (10 µg/ml) durante 24 h, reestimuladas con PMA (0,05 µg/ml), ionomicina (0,75 µg/ml) y brefeldina (1 µl/ml) durante 4 horas y marcadas con anticuerpos CD4 e IL-17 para analizarlas por citometría de flujo.

10. Extracción de miRNAs de sangre periférica de pacientes

Para separar el plasma sanguíneo de la sangre extraída a los pacientes y donantes sanos se centrifugó un mililitro de sangre con EDTA durante 20 minutos a 18.000 rpm a 4° C y se recogió la fase acuosa. Las muestras se lisaron con QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) y los miRNAs presentes en el plasma sanguíneo se aislaron mediante el miRNeasy mini kit (Qiagen) para obtener RNAs pequeños de a partir de 18 nucleótidos de longitud. El RNA extraído se retrotranscribió a cDNA usando primers específicos para cada miRNA y se cuantificó como se describe en el *apartado 12 (análisis por PCR cuantitativa)* utilizando sondas TaqMan, es decir, sondas con marcajes de fluorocromos que utilizan la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de DNA para detectar únicamente productos de amplificación específicos.

11. Extracción de RNA de tejidos y suspensiones celulares

Para cuantificar los niveles de expresión de los mRNAs y miRNAs de interés en las distintas poblaciones de linfocitos, las suspensiones celulares se centrifugaron 5 minutos a 3.500 rpm y lisadas con QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). En el caso de las muestras de tejido cardíaco, se seccionaron los corazones longitudinalmente y se lisó una de las mitades con QIAzol Lysis

Reagent (Qiagen) y un homogenizador T 10 Ultra-Turrax (Ika) hasta disgregarlas completamente. El RNA de las muestras lisadas se extrajo con el miRNeasy mini kit (Qiagen), un kit capaz de purificar el RNA total presente en una muestra, preservando los RNAs pequeños (desde 18 nucleótidos) como los miRNAs.

12. Análisis por PCR cuantitativa

Para cuantificar los niveles de expresión del RNA mensajero de los genes de interés, el RNA extraído se retrotranscribió a cDNA con el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) y la PCR cuantitativa se llevó a cabo con la enzima SYBR green master mix (Applied Biosystems) en un termociclador AB 7900 (Applied Biosystems) utilizando los siguientes oligonucleótidos:

	Secuencia 5'-3' forward	Secuencia 5'-3' reverse
β -Actina	CGGAACCGCTCATTGCC	ACCCACACTGTGCCCATCTA
GAPDH	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	ACCACAGTCCATGCCATCAC
TGF- β	CCGAAGCGGACTACTAT	GTAACGCCAGGAATTGT
IL-2	GTGCTCCTTGTC AACAGCG	GGGGAGTTTCAGGTTCTCTGA
IL-10	CCAAGCCTTATCGGAAATG	TGGCCTTG TAGACACC
FoxP3	CACCCAGGAAAGACAGCAACC	GCAAGAGCTCTTGTCCATTGA
AHR	CGAGATCTCCAGCCCTTTCTC	TTGCTTTTGGTGCGTATTGG
SOCS1	CTGCGGCTTCTATTGGGGAC	AAAAGGCAGTCGAAGGTCTCG

En el caso de los microRNAs, se sintetizó cDNA a partir de RNA total usando primers específicos para cada miRNA siguiendo el TaqMan microRNA assay protocol de Applied Biosystems. Este sistema permite amplificar miRNAs maduros en dos pasos: 1) síntesis de cDNA de cada miRNA usando primers específicos en stem-loop capaces de unirse a RNAs de sólo 22 nucleótidos aproximadamente y alargar su extremo 5' y 2) cuantificación por PCR cuantitativa gracias a que el alargamiento del amplicón permite la unión de dos primers y una sonda necesarios para la cuantificación. Los primers utilizados (TaqMan microRNA assays, Applied Biosystems) y sus referencias fueron los siguientes: snoRNA202 (001232), snoRNA135 (001230), mmu-miR-155 (002571), mmu-miR-706 (001641), mmu-miR-721 (001657), hsa-miR-17 (002308), hsa-miR-20a (000580) y dre-miR-301a (007574).

13. Microarray de microRNAs

Se extrajo el RNA total de los siguientes grupos de muestras: linfocitos T CD4⁺ naive WT y CD69KO activados con anti-CD3 y anti-CD28 (2 μ g/ml); linfocitos WT y CD69KO T_H17 diferenciados *in vitro* de manera policlonal con anti-CD3 y anti-CD28 (2 μ g/ml); y linfocitos

OTII y OTKO T_H17 diferenciados *in vitro* de manera antígeno-específica con células APCs irradiadas presentando el péptido de la OVA. Con 500 ng de RNA total de cada muestra se llevó a cabo un perfil de expresión de microRNAs mediante un microarray de miRNAs (Agilent Technologies).

De los resultados del microarray se extrajeron aquellos miRNAs cuya expresión difería en más de 1'8 veces entre las células WT y CD69KO y se buscaron sus dianas predichas en las bases de datos TargetScan y PicTar. Dado que es imposible predecir exactamente las dianas de un miRNA sólo en función de la complementariedad de secuencias porque los alineamientos casi perfectos entre un miRNA y su mRNA diana son poco corrientes en animales, es necesario recurrir a bases de datos como éstas, que proporcionan predicciones basadas en algoritmos que incorporan criterios basados tanto en la complementariedad de bases como en la conservación evolutiva. En el caso de los miRNAs que aparecían en las dos bases de datos, se tomaron sólo las dianas de la intersección entre ambas; mientras que en el caso de los miRNAs presentes sólo en TargetScan, se seleccionaron las dianas conservadas con sitios conservados. Finalmente, los miRNAs y sus potenciales dianas fueron analizados con Ingenuity, un programa informático capaz de priorizar las interacciones predichas entre miRNAs y mRNAs basándose en su contexto biológico y se seleccionaron únicamente aquellas interacciones relacionadas con funciones inmunológicas.

14. Inmunoelectroforesis (Western Blot)

Los corazones de ratón se lisaron y homogeneizaron con el T 10 Ultra-Turrax (Ika) en RIPA (20 mM Tris HCl pH 7'4, 37 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0'1% SDS, 0'5% deoxicolato sódico) con inhibidores de proteasas (PMSF, Sigma-Aldrich y Complete, Roche). Se cargaron 12 µg del extracto de proteínas en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Trans-Blot (BioRad). Los anticuerpos utilizados para revelar el WB fueron anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology), anti-SOCS1 (Santa Cruz Biotechnology) y anti-AHR (Enzo Life Sciences).

15. Inducción de la miocarditis experimental autoinmune (EAM)

El modelo de ratón de la EAM se indujo en ratones CD69^{+/+} y CD69^{-/-} con el fondo genético Balb/C mediante la inmunización de un péptido de la cadena pesada de la miosina-α específica de tejido cardíaco (MyHCα₆₁₄₋₆₂₉; Ac-SLKLMATLFSTYASAD-OH) emulsionado con el adyuvante CFA (Complete Freund's Adjuvant H37Ra, Difco Laboratories) en proporción 1:1. Los días 0 y 7 se inyectaron 100 µg del péptido emulsionado con CFA en un volumen final de 200 µl/ratón y el día 21 se analizó la fase aguda de la enfermedad. La fase aguda se desarrolla a los 21 días, en la que se detectan infiltrados leucocitarios en el miocardio y anticuerpos anti-

miosina cardiaca en el suero sanguíneo. La fase crónica de la enfermedad se desarrolla alrededor de 56 días después de la inmunización, cuando aparece fibrosis en el miocardio y pueden desarrollarse cardiomiopatías.

16. Tomografía Molecular de Fluorescencia (FMT)

Los ratones WT y CD69KO se inyectaron por vía intravenosa con 2 nmoles de Neutrophil Elastase 680 FAST (Perkin Elmer), sonda que produce fluorescencia cuando se une a la elastasa activada producida por los neutrófilos, durante la fase aguda de la EAM. 24 horas después los ratones fueron depilados, anestesiados con ketamina (20 μ l) y xilacina (15 μ l) y analizados por tomografía molecular de fluorescencia (FMT 2500 Fluorescence Tomography System, PerkinElmer). La FMT es una modalidad de tomografía óptica que permite obtener la distribución espacial 3D de la concentración de sondas moleculares fluorescentes en animales pequeños *in-vivo* de forma no invasiva. Las sondas fluorescentes se excitan y emiten en la zona NIR del espectro electromagnético (luz casi infrarroja, 600 nm-900 nm). Los resultados obtenidos fueron reconstruidos con el programa informático TrueQuant 3D (Perkin Elmer) para obtener la distribución espacial tridimensional de la concentración de la sonda molecular fluorescente en el corazón de los ratones. Para discriminar la fluorescencia inespecífica, se escanearon algunos ratones sin tratar inyectados con la sonda, de forma que pudiera establecerse el umbral correcto para cuantificar la señal fluorescente de los ratones tratados.

17. Análisis estadísticos

Los datos por pares se analizaron con el test estadístico *t* de Student y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de *P* fueron $P \leq 0.05$. Las comparaciones entre varios grupos se hicieron mediante el análisis de la varianza (ANOVA, *ANalysis Of Variance*) de una vía y la prueba de rango post hoc de Bonferroni. Dichos análisis estadísticos fueron realizados utilizando los programas Microsoft Excel 2007 (Microsoft Office) y Prism 5 (GraphPad Software).

RESULTADOS

1. Papel de CD69 en el desarrollo de las células nTregs y en la diferenciación y la función de las células iTregs.
 - 1.1. Proporción de células nTregs en el timo de ratones WT y CD69KO.
 - 1.2. Desarrollo de las nTregs en el timo de ratones WT y CD69KO en cultivos *ex vivo*.
 - 1.3. Diferenciación *in vitro* de células iTregs WT y CD69KO.
 - 1.4. Fenotipo de las células iTregs WT y CD69KO diferenciadas *in vitro*.
 - 1.5. Estudio de la función supresora de las células iTregs WT y CD69KO diferenciadas *in vitro*.
2. Regulación de la expresión de miRNAs mediada por CD69 en T_H17 y Tregs
 - 2.1. Análisis por microarray de miRNAs en linfocitos CD4⁺ naive y T_H17 WT y CD69KO.
 - 2.2. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro*.
 - 2.3. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos T_H17 generados *in vivo*.
 - 2.4. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos iTregs diferenciados *in vitro*.
 - 2.5. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos Tregs generados *in vivo*.
 - 2.6. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos T CD4⁺ naive.
3. Estudio de la expresión de las dianas predictivas de miR-721 y miR-155.
 - 3.1. Estudio de la expresión de las dianas predictivas en linfocitos T CD4⁺ naive.
 - 3.2. Estudio de la expresión de las dianas predictivas en linfocitos Tregs generados *in vivo*.
 - 3.3. Estudio de la expresión de las dianas predictivas en linfocitos T_H17 generados *in vivo*.
4. Papel de los miRNAs mediado por CD69 en el modelo animal de miocarditis experimental autoinmune.
 - 4.1. Niveles de expresión de miRNAs en corazón.
 - 4.2. Niveles de expresión de posibles dianas en corazón.
 - 4.3. Niveles de expresión de miRNAs en suero sanguíneo.
5. Análisis de linfocitos T_H17, células T reguladoras y expresión de miRNAs en la sangre de pacientes con cardiomiopatías.
 - 5.1. Análisis de linfocitos T CD4⁺ totales en sangre.
 - 5.2. Análisis de linfocitos T_H17 en sangre.
 - 5.3. Análisis de linfocitos Tregs totales, naive y de memoria en sangre.
 - 5.4. Niveles de expresión de miRNAs en el plasma sanguíneo.

1. Papel de CD69 en el desarrollo de las células nTregs y en la diferenciación y la función de las células iTregs.

1.1. Estudio de las células nTregs en el timo de ratones CD69WT y CD69KO.

Para explorar el papel de CD69 en las células T reguladoras naturales (nTregs) analizamos el porcentaje de células nTregs presentes en los timos de ratones WT y CD69KO de 4, 12 y 20 semanas de edad. De esta forma observamos que mientras que la proporción de células CD4⁺ simples positivas (CD4SP) no se ve afectada en los ratones CD69KO, la población de nTregs en el timo de los ratones de 4 semanas deficientes en CD69 está reducida significativamente (Fig. 1).

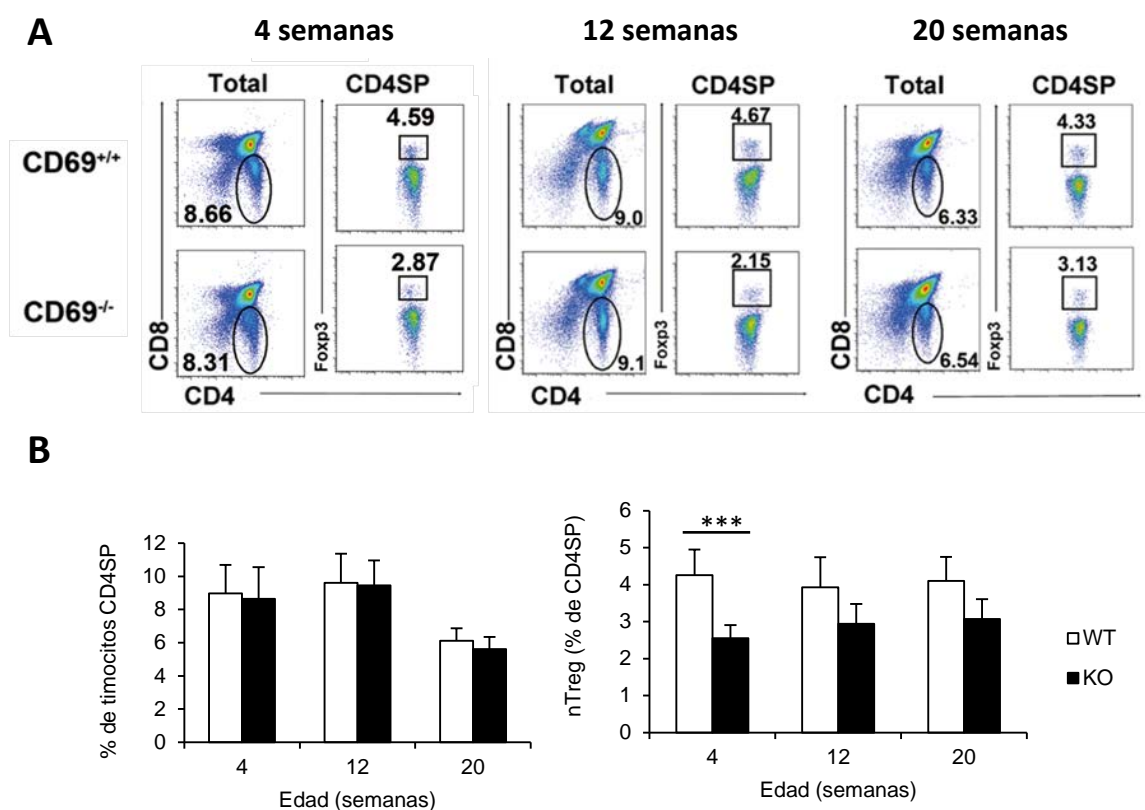


Figura 1. La deficiencia en CD69 reduce significativamente la población de nTregs en el timo de animales de 4 semanas sin afectar a la proporción de timocitos CD4⁺ simples positivos (CD4SP) totales. (a) Dot plots representativos de la proporción de timocitos CD4⁺ simples positivos (CD4SP) totales y de nTregs en los timos de ratones WT y CD69KO de 4, 12 y 20 semanas de edad. (b) Porcentaje de timocitos CD4SP y nTregs en los timos de ratones WT y CD69KO de 4, 12 y 20 semanas de edad. Las barras de error representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes (n = 3). (***) P < 0.001, T de Student).

Sin embargo, los ratones CD69KO no tienen alterada la homeostasis de las células Treg CD4⁺ FoxP3⁺ en los órganos linfoides secundarios, ya que no existen diferencias significativas en los

porcentajes de células Treg ni en el bazo ni en los ganglios mesentéricos ni periféricos entre los ratones WT y los ratones deficientes en CD69 a 4, 12 y 20 semanas de edad (Fig. 2).

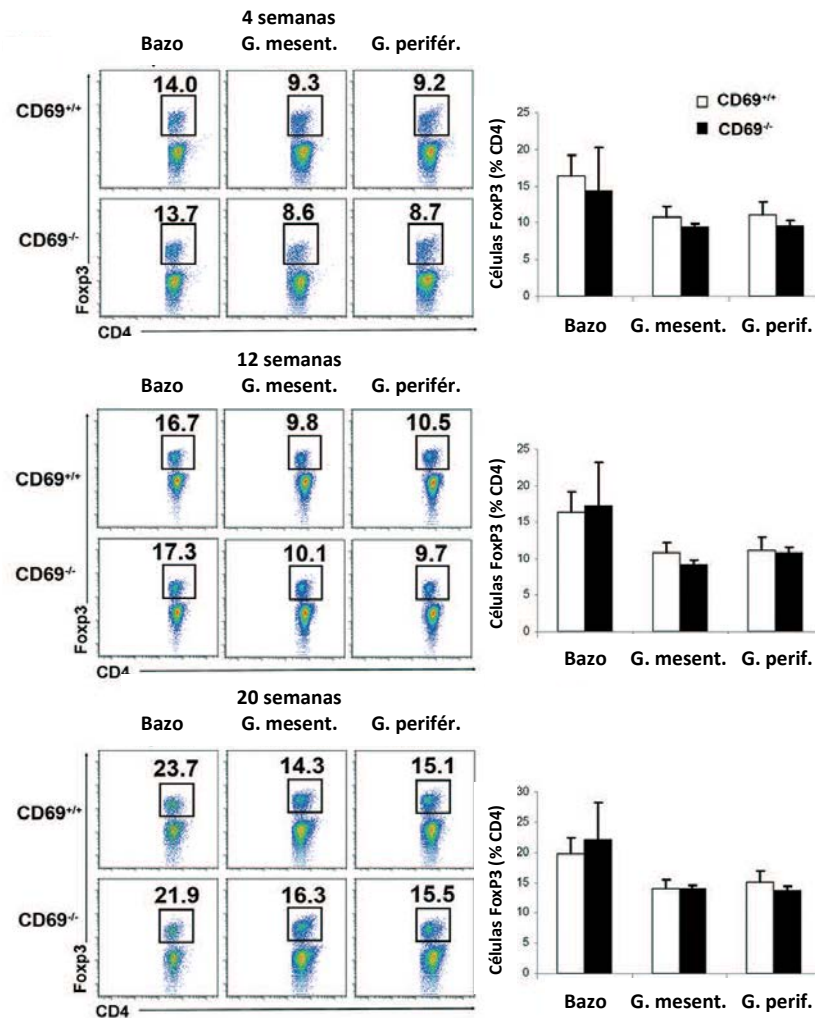


Figura 2. La deficiencia en CD69 no altera la proporción de células Tregs en los órganos linfoides secundarios. *Izquierda*, Dot plots representativos de las células Tregs en el bazo y en los ganglios mesentéricos (G. mesent) y periféricos (G. perifér.) de ratones WT y CD69KO de 4, 12 y 20 semanas de edad. *Derecha*, Histogramas. Las barras de error representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes ($n = 3$). Las diferencias mostradas no son significativas ($P > 0.05$, T de Student).

1.2. Desarrollo de las nTregs en el timo de ratones WT y CD69KO en cultivos *ex vivo*.

Para investigar si CD69 tiene algún papel en la generación de las células T reguladoras naturales en el timo, se realizaron cultivos de timos fetales (FTOC, *Fetal Thymus Organ Culture*) con lóbulos tímicos de embriones de ratones WT y CD69KO de 16,5 días de edad y los analizamos durante 15 días. El análisis reveló que la ausencia de CD69 no afecta a la diferenciación de los timocitos CD4⁺ simples positivos (CD4SP) totales, pero sí reduce significativamente la generación de nTregs en el timo (Fig. 3).

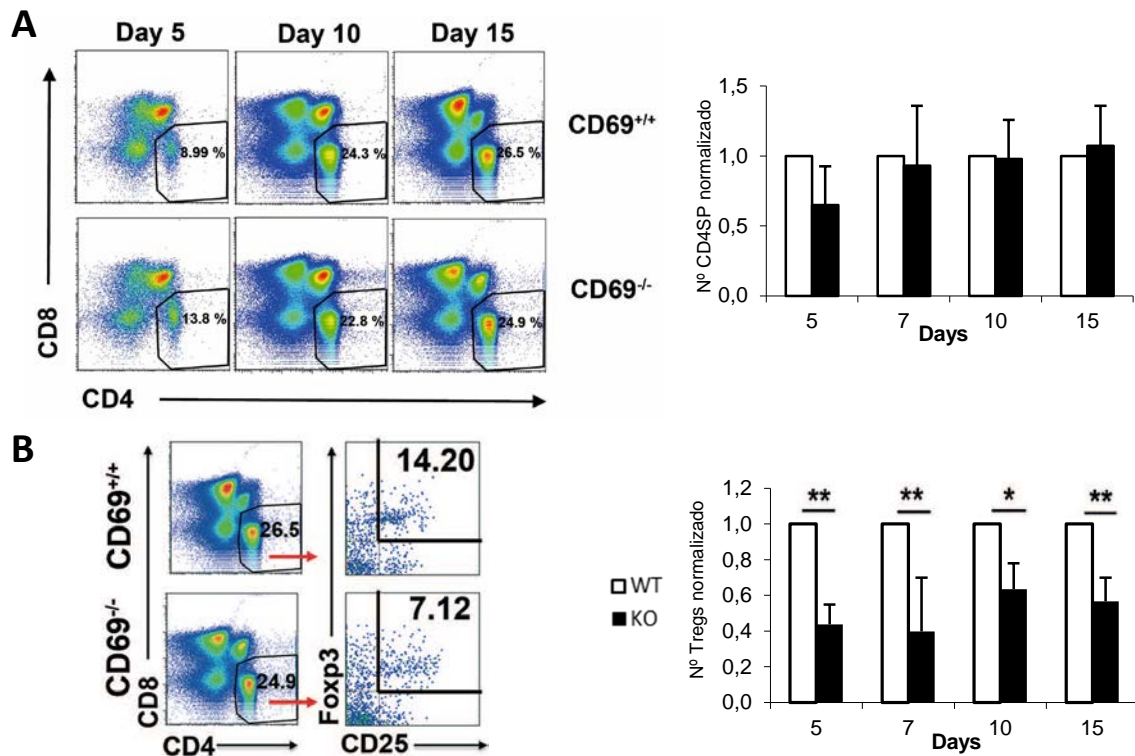


Figura 3. La expresión de CD69 es necesaria para la generación de las células nTregs, pero no para la formación de los timocitos CD4SP totales. (a) *Izquierda*, dot plots representativos de la diferenciación de timocitos CD4SP en lóbulos tímicos de embriones de ratones CD69^{+/+} y CD69^{-/-} en cultivos FTOC a diferentes días. *Derecha*, cinética de generación de células CD4SP en cultivos FTOC de ratones CD69^{+/+} y CD69^{-/-} en términos absolutos. Los valores fueron relativizados a los datos de los lóbulos control WT en 4 experimentos independientes. Las diferencias mostradas no son significativas ($P > 0.05$, T de Student). (b) *Izquierda*, dot plots representativos de un FTOC a día 15 mostrando que los timocitos CD4SP de lóbulos CD69KO contienen menor proporción de células nTregs que los WTs. *Derecha*, cinética de generación de células nTregs en cultivos FTOC de ratones CD69^{+/+} y CD69^{-/-} en términos absolutos. Los valores fueron relativizados a los datos de los lóbulos control WT en 4 experimentos independientes. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, T de Student).

1.3. Diferenciación *in vitro* de células iTregs WT y CD69KO.

Para investigar si CD69 también condiciona la diferenciación de las iTregs, se aislaron linfocitos T CD4⁺ naive de bazo y ganglios mesentéricos de ratones transgénicos OTII y OTKO (ratones caracterizados por expresar un TCR que reconoce específicamente el péptido 323-339 de OVA en el contexto de I-A^b) y se cultivaron 72 h con IL-2 y TGF- β en presencia de células presentadoras de antígenos irradiadas y el péptido de la OVA. El análisis del cultivo reveló que no hay diferencias significativas en la diferenciación *in vitro* de células T CD4⁺ naive en iTregs entre los ratones WTs y KOs, sugiriendo que la ausencia de CD69 no altera la generación de los linfocitos T reguladores inducibles (Fig. 4).

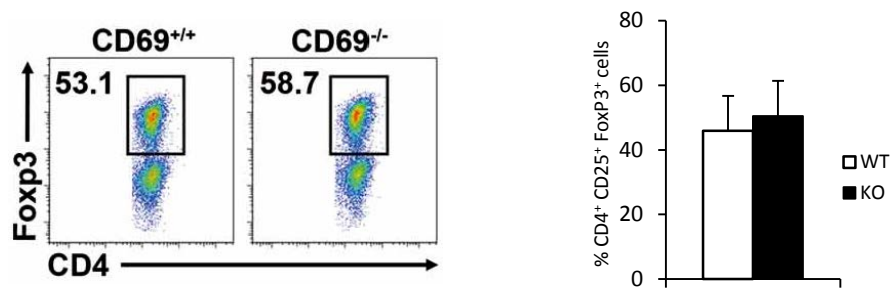


Figura 4. La ausencia de CD69 no afecta a la diferenciación *in vitro* de los linfocitos iTregs. Análisis por citometría de flujo con los porcentajes representativos de iTregs CD4⁺ FoxP3⁺ diferenciadas *in vitro* a partir de células T CD4⁺ naive OTII y OTKO cultivadas durante 72 h con IL-2, TGF- β y células presentadoras de antígenos irradiadas en presencia de OVAp. Los datos representan la media aritmética \pm SD de 9 experimentos independientes (n = 3). La diferencia mostrada no es significativa (P > 0.05, T de Student).

1.4. Fenotipo de las células iTregs WT y CD69KO diferenciadas *in vitro*.

Para determinar el fenotipo de las células iTregs diferenciadas *in vitro* deficientes en CD69, se analizaron distintos marcadores relacionados con las células T reguladoras por citometría de flujo. No se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos en ninguno de los marcadores analizados (Fig 5).

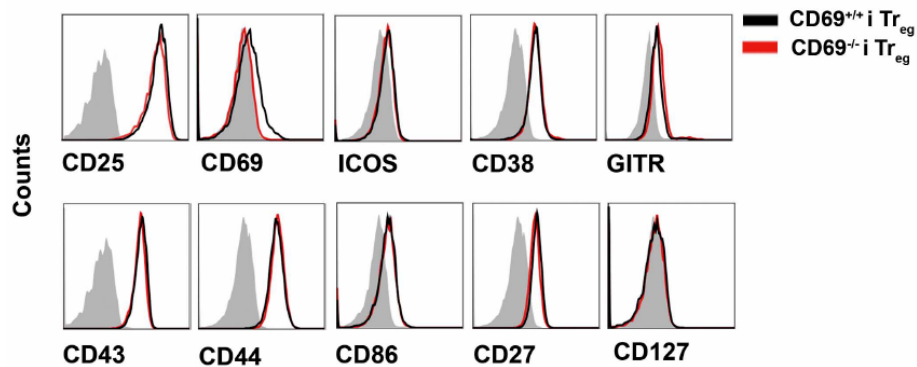


Figura 5. La ausencia de CD69 no afecta al fenotipo de las iTregs diferenciadas *in vitro*. Análisis por citometría de flujo de la expresión de distintos marcadores en células iTregs diferenciadas *in vitro* de ratones CD69^{+/+} y CD69^{-/-}. Histogramas representativos de 7 experimentos independientes (n = 3). Las curvas grises corresponden a los controles negativos.

También se analizaron los patrones de expresión de las citoquinas TGF- β , IL-2 e IL-10 por células iTregs OTII y OTKO diferenciadas *in vitro*. Para ello se reestimularon con PMA e

ionomicina durante 4 horas las células que habían sido polarizadas hacia iTregs y se midieron los niveles de expresión de RNA mensajero mediante qPCR, y de proteína mediante ELISA. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de TGF- β ni IL-2 entre las iTregs WT y CD69KO, pero se detectó una significativa reducción de la expresión de la IL-10 en las células CD69KO respecto a las WT tanto a nivel de mRNA como de proteína (Fig. 6).

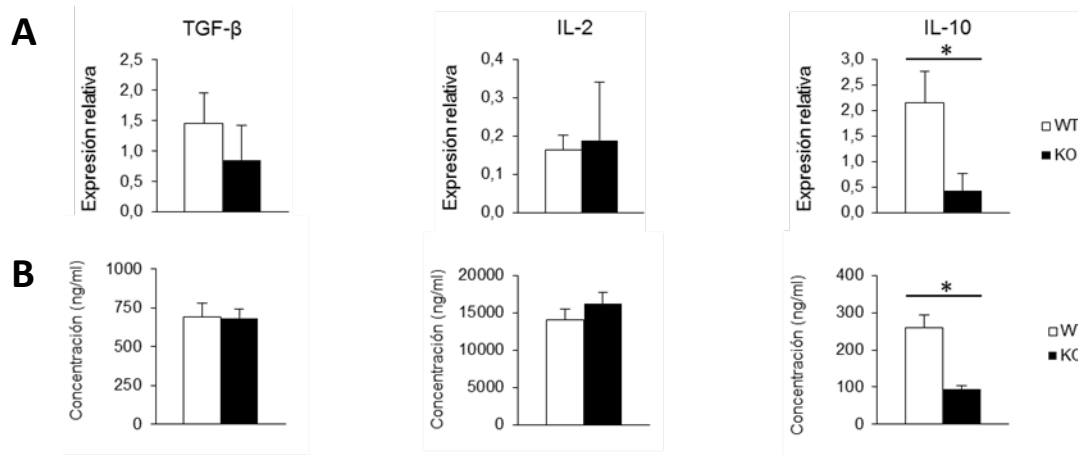


Figura 6. Las iTregs CD69KO expresan menos IL-10 que las iTregs WT. (a) Niveles de expresión de TGF- β , IL-2 e IL-10 a nivel de RNA mensajero medidos por qPCR en células iTregs WT y CD69KO diferenciadas *in vitro*. (b) Análisis de la secreción de TGF- β , IL-2 e IL-10 de células iTregs WT y CD69KO diferenciadas *in vitro* medidos por ELISA. Las barras representan la media aritmética \pm SD de un experimento representativo de 3 independientes (n = 3) (* P < 0.05, T de Student).

También se analizaron los niveles del factor de transcripción FoxP3, el principal regulador del desarrollo y la funcionalidad de las células T reguladoras, y no se encontraron diferencias en los niveles del mRNA ni de la proteína entre iTregs WT y CD69KO diferenciadas *in vitro* (Fig. 7).

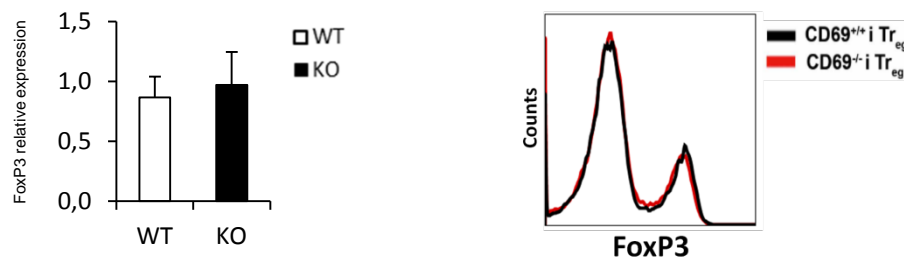


Figura 7. La ausencia de CD69 no afecta a los niveles de FoxP3 de las células iTregs diferenciadas *in vitro*. Niveles de expresión de RNA mensajero de FoxP3 (izquierda) y de proteína (derecha) en células iTregs WT y CD69KO diferenciadas *in vitro* medidos por qPCR y por citometría de flujo respectivamente. El histograma representa la media aritmética \pm SD de 4 experimentos independientes (n = 3). La diferencia mostrada no es significativa (P > 0.05, T de Student).

1.5. Estudio de la función supresora de las células iTregs WT y CD69KO diferenciadas *in vitro*.

Dado que entre los mecanismos de supresión de las células Tregs está la inhibición de la respuesta efectora mediante la secreción de IL-10, se investigó si la reducción en la expresión de esta citoquina por parte de las células iTregs CD69KO podría tener consecuencias en su funcionalidad. Primeramente se llevaron a cabo ensayos de proliferación con timidina tritiada en cultivos de diferenciación *in vitro* de iTregs y no se encontraron diferencias en la proliferación entre las células iTregs WT y CD69KO (Fig. 8).

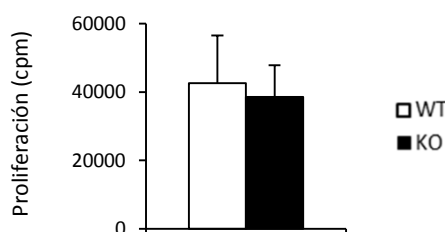


Figura 8. La ausencia de CD69 no afecta a la capacidad de proliferación de las iTregs diferenciadas *in vitro*. Ensayo de proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada (T^3H) en cultivos de diferenciación de iTregs WT y CD69KO. El histograma representa la media aritmética \pm SD de 3 experimentos independientes ($n = 2$). La diferencia mostrada no es significativa ($P > 0.05$, T de Student).

A continuación se hicieron ensayos de supresión en los que se co-cultivaron iTregs diferenciadas *in vitro* con células T convencionales en presencia de anti-CD3 y anti-CD28, donde se analizó la capacidad de proliferación de las Tconv en presencia de Tregs. El análisis de la proliferación de las células T convencionales reveló que las cultivadas con las células iTregs CD69KO proliferan más que las cultivadas con iTregs WT y, por tanto, que las células iTregs CD69KO tienen alterada su capacidad supresora de la actividad inmune en comparación con las iTregs WT (Fig. 9).

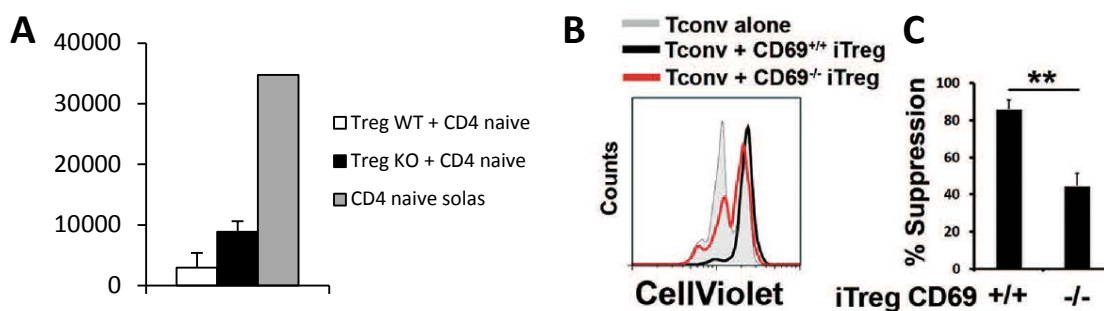


Figura 9. Las células iTregs CD69KO tienen inhibida su capacidad supresora. Análisis de la proliferación de células T convencionales CD4⁺ naive en cultivos de supresión con células iTregs WT ó CD69KO diferenciadas *in vitro*, por incorporación de T^3H , (a) o mediante dilución del marcaje con

CellTrace Violet (b). (c) Cuantificación de la capacidad supresora de las células Tregs inducibles WT y CD69KO en ensayos de supresión. Las barras de error representan la media \pm SD. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, T de Student).

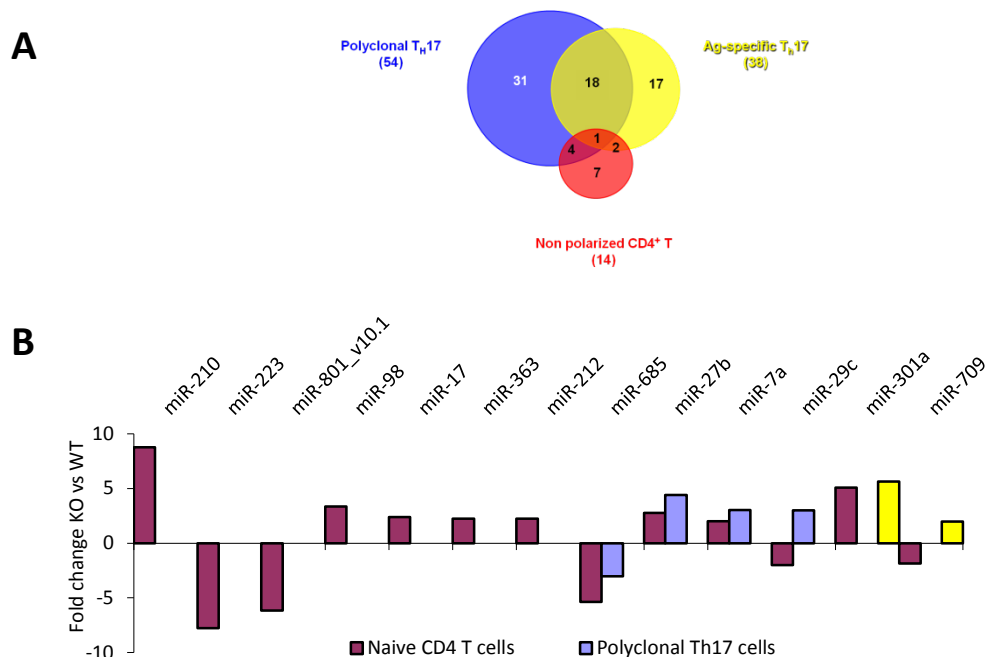
2. Regulación de la expresión de miRNAs mediada por CD69 en T_H17 y Tregs

CD69 es una molécula importante en la diferenciación de células T reguladoras y un potente inhibidor de la diferenciación de T_H17, tanto en homeostasis como en situaciones de inflamación. Dado que los miRNAs desempeñan un papel crucial en la inmunidad innata y adaptativa controlando tanto la diferenciación de muchos tipos celulares como sus funciones inmunológicas, investigamos el papel de los miRNAs regulados por CD69 en el balance entre T_H17 y Tregs.

1.6. Análisis por microarray de miRNAs en linfocitos CD4⁺ naive y T_H17 WT y CD69KO.

Como primer abordaje se realizó un microarray para analizar e identificar los miRNAs de ratón cuya expresión difería entre muestras WT y CD69KO: 1) de células CD4⁺ naive; 2) de linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro* estimulados de manera policlonal con anti-CD3 y anti-CD28; ó 3) de linfocitos OTII y OTKO T_H17 diferenciados *in vitro* estimulados de manera antígeno-específica con células APCs irradiadas presentando el péptido de la OVA.

Mediante esta aproximación se identificaron 80 miRNAs cuya expresión era al menos 1,8 veces mayor o menor en las células CD69KO que en las WT. Algunos miRNAs se expresan de forma diferente en presencia/ausencia de CD69 sólo en las células CD4⁺ naive, sólo en las T_H17 estimuladas policlonalmente o sólo en las T_H17 estimuladas de manera Ag-específica; mientras que la expresión de otros miRNAs aumenta o disminuye en las células CD69KO respecto a las WT en varias de las poblaciones celulares estudiadas (Fig. 10; Tabla S1).



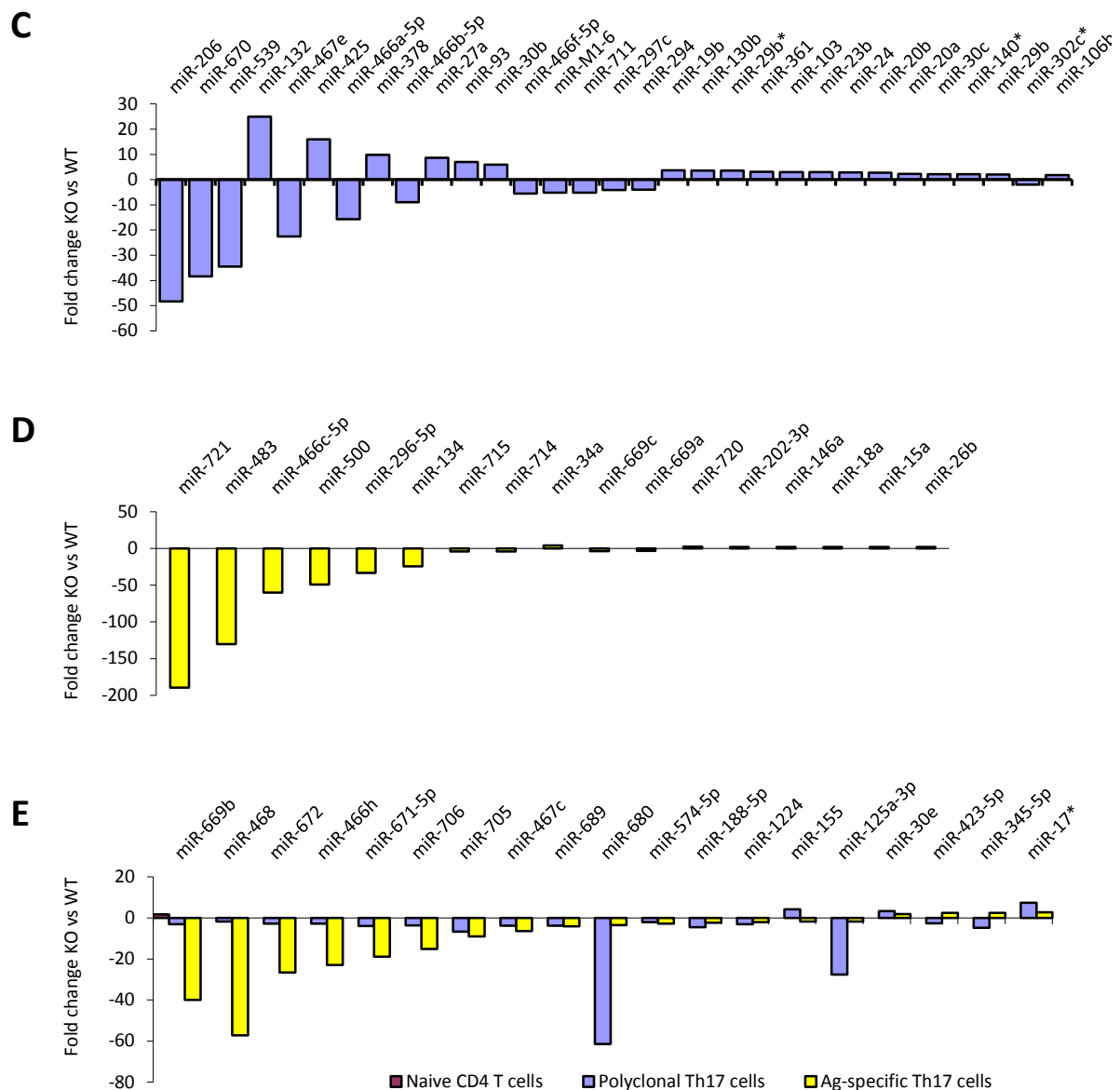


Figura 10. Variabilidad en la expresión de miRNAs en linfocitos CD4⁺ naive y/o T_H17 deficientes en CD69 respecto a las células WT. (a) Diagrama de Venn representando el número de miRNAs expresados diferencialmente entre WT y CD69KO de linfocitos CD4⁺ naive y/o en linfocitos T_H17. Análisis del microarray de miRNAs. Incremento o reducción de los niveles de expresión entre células CD69KO y WT de miRNAs cuya expresión varía en células T CD4⁺ no polarizadas (b); sólo en linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro* estimulados de manera policlonal (c); sólo en linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro* estimulados de manera antígeno específica (d); o en ambas poblaciones de linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro* y en las tres poblaciones analizadas (e).

Una vez identificados los miRNAs cuya expresión varía en ausencia de CD69 en las muestras analizadas, se llevó a cabo un análisis predictivo con las bases de datos TargetScan y PicTar para buscar las posibles dianas de estos miRNAs. La introducción de los miRNAs de interés en

esta base de datos devolvió una cantidad enorme de genes potencialmente regulados por cada miRNA, entre los cuales destacan SOCS1, S1P₁, AHR, STAT3 y ROR γ t por sus conocidas funciones en la biología de los linfocitos T_H17 y T reguladores (Fig. 11).

En concreto, se encontró que miR-155 regula al supresor de la señalización de citoquinas 1 (SOCS1), un regulador negativo de la vía Jak/Stat que juega un papel muy importante en la integridad y la funcionalidad de las Tregs manteniendo la expresión de FoxP3 y suprimiendo la producción de IFN- γ e IL-17 a través de los factores de transcripción STAT1 y STAT3. De hecho, esta predicción ya ha sido confirmada y descrita en distintos trabajos (Lu et al., 2009; Yao et al., 2012). MiR-155 presenta otra posible diana con funciones inmunológicas, el receptor 1 de la esfingosina 1-fosfato (S1P₁), una proteína que participa en la salida de los linfocitos de los ganglios linfáticos y que es regulado por CD69 durante la respuesta inmune. S1P₁ también aparece como una potencial diana de miR-721 y miR-301a, miRNAs que a su vez podrían regular la expresión del receptor del aril-hidrocarburo (AHR), un receptor expresado por las células T reguladoras y las T_H17 que puede tener efectos opuestos en la diferenciación de estos tipos celulares en función del ligando. miR-706 también presenta como diana posible al AHR. Por último, entre las posibles genes dianas de los miRNAs miR-17 y miR-20a se encuentran el Receptor Nuclear Huérfano Relacionado con el Ácido retinoico γ t (ROR γ t, Retinoic Acid-Related Orphan Receptor gamma t), el principal regulador de la diferenciación de los linfocitos T_H17, y el Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3 (STAT3), el factor de transcripción que induce ROR γ t y down-regula FoxP3 (Fig. 11).

miRNA	EXPRESIÓN EN CÉLULAS KO vs WT (n° veces)			GENES DIANA	FUNCIONES DE LOS GENES DIANA
	CD4 ⁺ naïve	T _H 17 policlinales	T _H 17 Ag-específico		
miR-155		4,3	-1,8	SOCS1 S1P ₁	Inhibe la capacidad competitiva de las Treg. Favorece la salida de las células T de los ganglios linfáticos y la diferenciación de las T _H 17.
miR-721			-190	CD69 AHR S1P ₁	Control negativo interno. Controla la diferenciación de las Treg y T _H 17. Favorece la salida de las células T de los ganglios linfáticos y la diferenciación de las T _H 17.
miR-301a	5,1		5,6		
miR-706		-3,7	-15,1	AHR	Controla la diferenciación de las Treg y T _H 17.
miR-17	2,4			CD69 STAT3 ROR γ t	Control negativo interno. Induce ROR γ t y down-regula FoxP3. El principal regulador de las T _H 17 .
miR-20a		2,3			

Figura 11. Análisis de las posibles dianas para los microRNAs miR-155, miR-721, miR-301a, miR-706, miR-17 y miR-20a. *Izquierda*, miRNAs expresados diferencialmente en linfocitos T CD4⁺ naïve y/o en linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro* de WT o KO. Los números representan la cantidad de veces que aumenta o disminuye la expresión del miRNA en las células CD69KO respecto a las WTs. *Derecha*, dianas predichas de cada miRNA y sus funciones descritas.

1.7. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro*.

Para validar la expresión de los microRNAs de interés, se generaron nuevas muestras de linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro* estimulados de forma antígeno-específica y se analizó la expresión de los mismos. Tras el análisis de la expresión de miR-155, miR-706, miR-721, miR-17, miR-20a y miR-301a por qPCR, se encontró una disminución en la expresión de miR-721 por parte de las células CD69KO en comparación con las WTs y un aumento en la expresión de miR-301a (Fig. 12), ambos resultados consistentes con los obtenidos en el microarray (Fig. 11). Sin embargo, hay que tener en cuenta las limitaciones de los cultivos de diferenciación celular. Como puede observarse en la figura 12a, las muestras generadas no contienen un 100% de células T_H17 y, por tanto, es importante valorar la presencia de otros tipos celulares a la hora de interpretar los resultados obtenidos con dichas muestras.

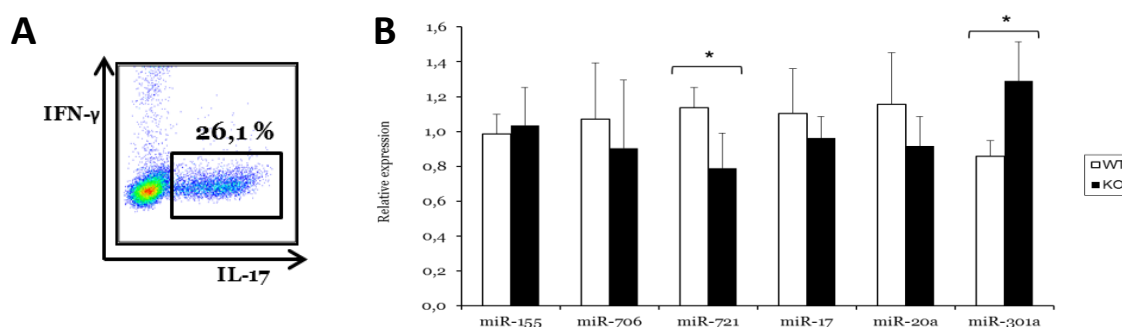


Figura 12. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro*. (a) Dot plot representativo del porcentaje de linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro* de manera antígeno-específica. (b) Expresión relativa de los miRNAs seleccionados en linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro* WT y CD69KO cuantificada mediante qPCR. El histograma representa la media aritmética \pm SD de 4 experimentos independientes (n = 3) (* P < 0.05, T de Student).

1.8. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos T_H17 generados *in vivo*.

Para optimizar la pureza de linfocitos T_H17 presentes en las muestras analizadas, se generaron células T_H17 *in vivo* mediante la inmunización de ratones con un péptido derivado de la cadena pesada α de la miosina cardiaca (MyHC α) emulsionado con CFA (Complete Freund's Adjuvant). Se obtuvieron las células de los ganglios linfáticos drenantes y tras cultivarlas con con el péptido MyHC α e IL-23 y marcarlas con IL-17 intracelular, se aislaron los linfocitos T_H17 mediante sorting. Las muestras obtenidas, que contenían más de un 90% de células T_H17, fueron analizadas por qPCR. Estos experimentos demostraron que la ausencia de CD69 en las células T_H17 reduce significativamente la expresión de miR-706, miR-17, miR-20a y miR-301a, mientras que la expresión de miR-721 se encuentra muy aumentada (Fig. 13).

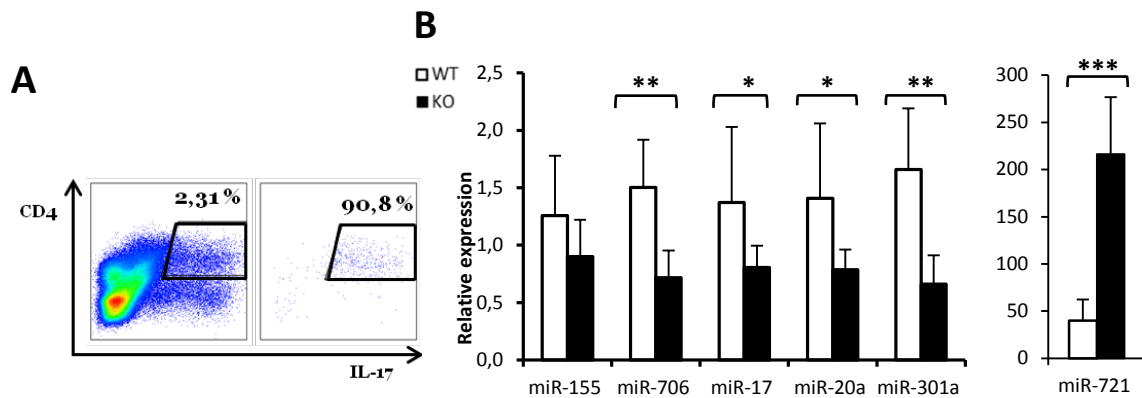


Figura 13. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos T_H17 generados *in vivo*. (a) Dot plot representativo del porcentaje de linfocitos T_H17 generados *in vivo* y aislados mediante sorting. (b) Análisis por qPCR de la expresión relativa de los miRNAs expresados en linfocitos T_H17 WT y CD69KO generados *in vivo*. El histograma representa la media aritmética \pm SD de un experimento representativo de 2 experimentos independientes (n = 6) (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, T de Student).

1.9. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos Tregs inducibles diferenciados *in vitro*.

Después de encontrar diferencias en el patrón de expresión de distintos miRNAs en linfocitos T_H17 deficientes en CD69 en comparación con los WT, quisimos estudiar estos miRNAs en las células T reguladoras. Para ello se polarizaron células T CD4⁺ naive OTII y OTKO hacia Tregs co-cultivándolas con IL-2 y TGF- β junto con células presentadoras de antígenos irradiadas y en presencia del péptido de la OVA. Las células Tregs CD69KO diferenciadas *in vitro* mostraron niveles de expresión menores de miR-155, miR-721, miR-17 y miR-20a que las Tregs WTs, pero un nivel de expresión mayor de miR-301a (Fig. 14).

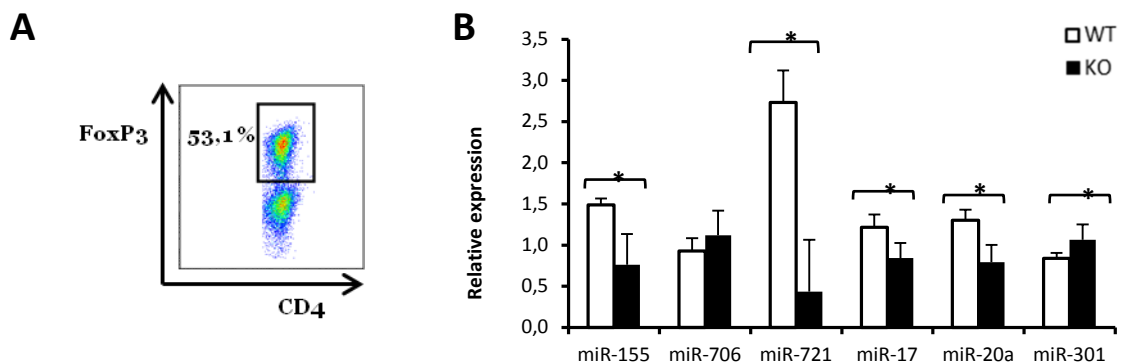


Figura 14. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos Tregs inducibles diferenciados *in vitro*. (a) Dot plot representativo del porcentaje de linfocitos Tregs inducibles diferenciados *in vitro*. (b) Análisis por qPCR de la expresión relativa de miRNAs en linfocitos Tregs WT y CD69KO diferenciados *in vitro*. El histograma representa la media aritmética \pm SD de 4 experimentos independientes (n = 3) (* P < 0.05, T de Student).

1.10. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos Tregs generados *in vivo*.

De nuevo con el objetivo de incrementar la pureza de las Tregs en las muestras analizadas, se realizó su generación *in vivo*. Se obtuvieron nuevamente de ratones inmunizados con el péptido (MyHC α) y se extrajeron del bazo y los ganglios linfáticos drenantes, pero en este caso las células T CD4⁺ CD25⁺ se aislaron directamente mediante separación magnética. El análisis por qPCR reveló una disminución significativa en la expresión de miR-706 y miR-721 por parte de las células Tregs CD69KO en comparación con las WTs (Fig. 15).

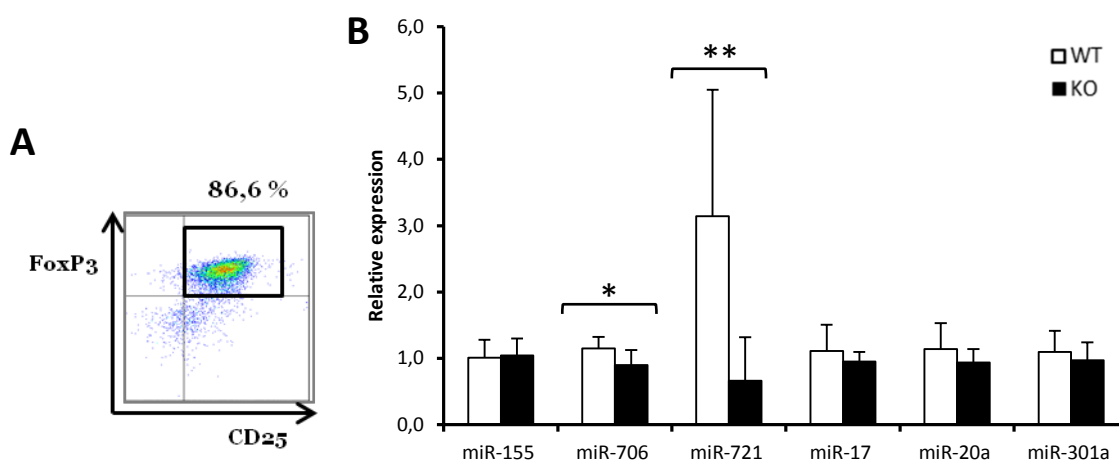


Figura 15. Niveles de expresión de miRNAs en linfocitos Tregs generados *in vivo*. (a) Dot plot representativo del porcentaje de linfocitos Tregs aislados. (b) Expresión relativa de miRNAs en linfocitos Tregs WT y CD69KO cuantificada mediante qPCR. El histograma representa la media aritmética \pm SD de 2 experimentos independientes (n = 6) (* P < 0.05, ** P < 0.01, T de Student).

1.11. Niveles de expresión de miR-721 en linfocitos T CD4⁺ naïve.

Tras observar que miR-721 es el único miRNA de entre los miRNAs estudiados cuyos niveles de expresión varían de forma opuesta en los linfocitos T_H17 deficientes en CD69 que en los T reguladores, se investigó su expresión en las células T CD4⁺ naïve. Se observó que las células CD4⁺ naïve CD69KO expresan más miR-721 que las WTs, pero en niveles muy inferiores a los de los linfocitos diferenciados. Las células Tregs expresan significativamente más miR-721 que las células T CD4⁺ naïve, y a su vez, los linfocitos T_H17 expresan cantidades muy superiores a las de las células T naïve y T reguladoras (Fig. 16).

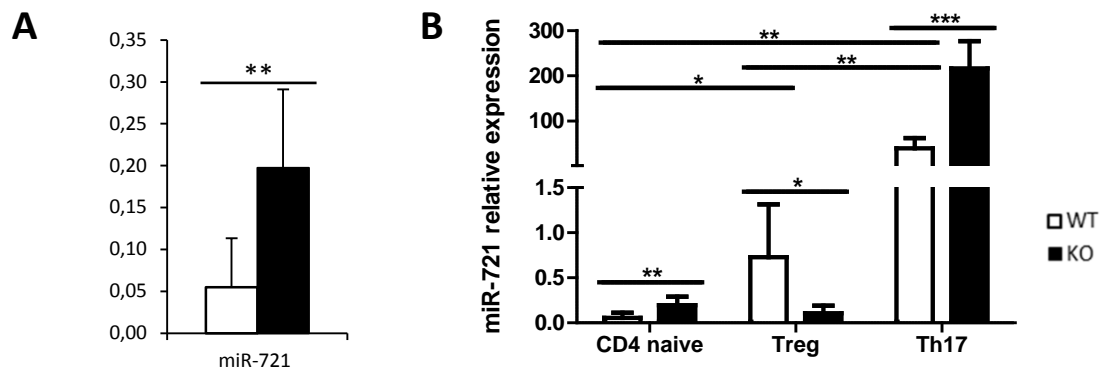


Figura 16. Niveles de expresión de miR-721 en células T CD4⁺ naive, Tregs y T_H17. (a) Expresión relativa de miR-721 en células T CD4⁺ naive WT y CD69KO. El histograma representa la media aritmética \pm SD (n = 6) (* P < 0.05, ** P < 0.01, T de Student). (b) Expresión relativa de miR-721 en células T CD4⁺ naive, Tregs y T_H17 WT y CD69KO. Las barras de error representan la media \pm SD. (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, T de Student).

3. Estudio de la expresión de las dianas predictivas de miR-721 y miR-155.

Viendo ya que CD69 podría estar regulando la expresión de varios microRNAs en las células T CD4⁺ naive, en las células T reguladoras y en las células T_H17, a continuación investigamos la expresión de las dianas predictivas de estos miRNAs. Dado que los resultados más prometedores fueron los obtenidos con el miR-721, se analizaron los niveles de expresión de RNA mensajero y de proteína de una de sus dianas predictivas más interesantes: el receptor del aril-hidrocarburo (AHR), un receptor expresado, entre otras, por las células T reguladoras y las células T_H17 que puede tener efectos opuestos en la diferenciación de estos tipos celulares en función del ligando que se le una (Quintana et al., 2008).

Además, estudiamos la expresión del supresor de la señalización de citoquinas 1 (SOCS1), diana de miR-155, un regulador negativo de la vía Jak/Stat que juega un papel muy importante en la integridad y la funcionalidad de las Tregs manteniendo la expresión de FoxP3 y suprimiendo la producción de IFN- γ e IL-17 a través de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 (Lu et al., 2010).

1.12. Estudio de la expresión de las dianas predictivas en linfocitos T CD4⁺ naive.

Se analizaron los niveles de expresión de RNA mensajero de AHR y de SOCS1 en los linfocitos T CD4⁺ naive, no encontrándose diferencias significativas en su expresión entre las células WT y CD69KO (Fig. 17).

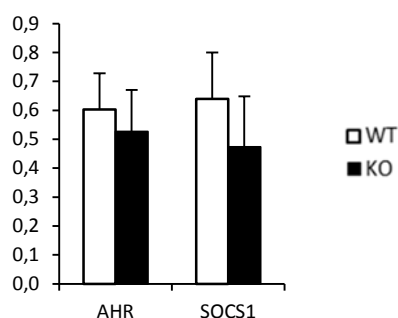


Figura 17. Niveles de mRNA de AHR y SOCS1 en linfocitos T CD4⁺ naive WT y CD69KO. Expresión relativa de mRNA de AHR y SOCS1 en linfocitos T CD4⁺ naive WT y CD69KO medidos por qPCR. Las barras de error representan la media \pm SD (n = 6). Las diferencias mostradas no son significativas (P > 0.05, T de Student).

El marcaje con un anticuerpo anti-AHR y el posterior análisis por citometría de flujo no revelaron diferencias significativas en la expresión de AHR entre los linfocitos T CD4⁺ naive WT y CD69KO (Fig. 18).

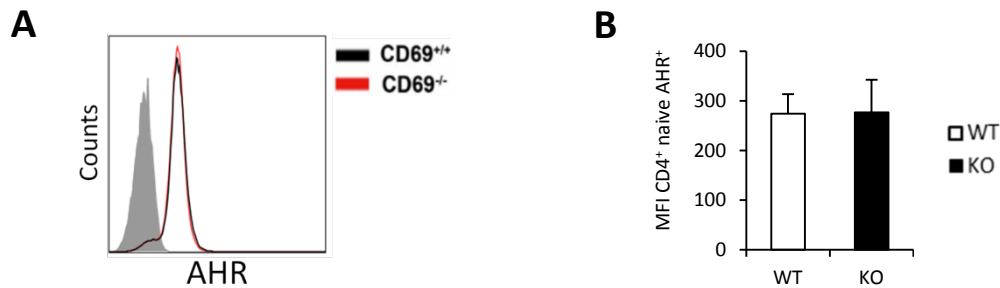


Figura 18. Expresión del AHR en linfocitos T CD4⁺ naive WT y CD69KO. (a) Histograma representativo de la expresión de AHR en linfocitos T CD4⁺ naive WT y CD69KO analizada por FACS. (b) Cuantificación de la media de la intensidad de la fluorescencia de la expresión de AHR en linfocitos T CD4⁺ naive WT y CD69KO. Las barras de error representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes (n = 6). Las diferencias mostradas no son significativas ($P > 0.05$, T de Student).

1.13. Estudio de la expresión de las dianas predictivas en linfocitos Tregs generados *in vivo*.

A continuación se estudiaron los niveles de mRNA de AHR y SOCS1 en los linfocitos T reguladores generados *in vivo* y aislados por separación magnética. El análisis por qPCR reveló que no hay diferencias significativas en los niveles de mRNA de AHR y SOCS1 entre las células Tregs WT y CD69KO (Fig. 19).

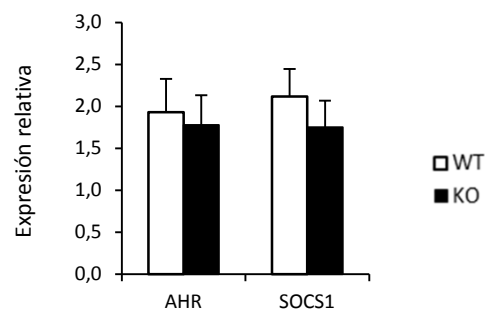


Figura 19. Expresión de mRNA de AHR y SOCS1 en linfocitos Tregs WT y CD69KO. Análisis por qPCR de la expresión relativa de AHR y SOCS1 a nivel de RNA mensajero en linfocitos Tregs WT y CD69KO generados *in vivo*. Las barras de error representan la media \pm SD (n = 6). Las diferencias mostradas no son significativas ($P > 0.05$, T de Student).

El marcaje de AHR por citometría de flujo tampoco mostró ninguna diferencia significativa en los niveles de expresión de AHR entre las Tregs WT y CD69KO (Fig. 20).

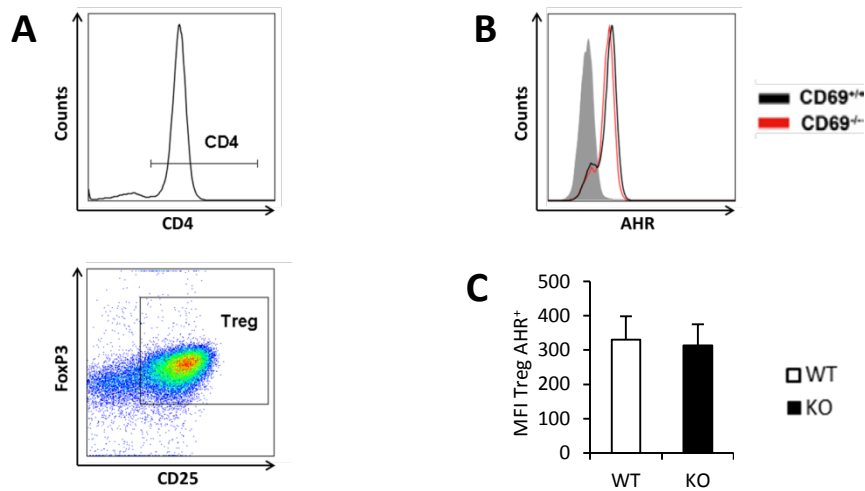


Figura 20. Expresión de AHR en linfocitos Tregs WT y CD69KO. (a) Dot plots representativos de las células Tregs generadas *in vivo*. (b) Histograma representativo de la expresión de AHR en linfocitos Tregs WT y CD69KO. (c) Cuantificación del porcentaje de células Tregs AHR⁺ y de la media de la intensidad de la fluorescencia de AHR en linfocitos Tregs WT y CD69KO generados *in vivo* medida por citometría de flujo. Las barras de error representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes (n = 6). Las diferencias mostradas no son significativas ($P > 0.05$, T de Student).

1.14. Estudio de la expresión de las dianas predictivas en linfocitos T_H17 generados *in vivo*.

Por último se exploró la expresión del AHR en los linfocitos T_H17 generados *in vivo*. En estas células se encontró un aumento significativo de los niveles de mRNA en las T_H17 CD69KO respecto a las WT, mientras que en el caso de SOCS1 no se encontró ninguna diferencia significativa entre los ratones WT y los CD69KO (Fig. 21).

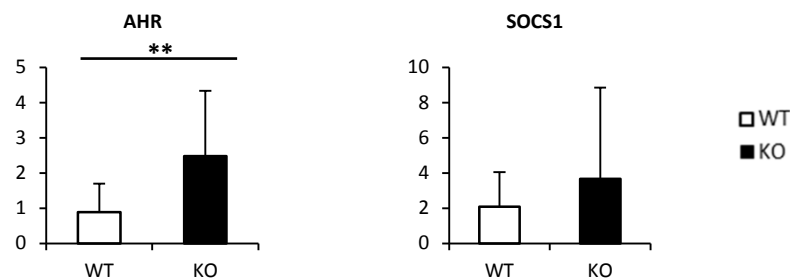


Figura 21. Análisis de mRNA de AHR y SOCS1 en linfocitos T_H17 WT y CD69KO. Expresión relativa de AHR y SOCS1 a nivel de RNA mensajero en linfocitos T_H17 WT y CD69KO generados *in vivo* y analizados por qPCR. Las barras de error representan la media \pm SD de 2 experimentos independientes (n = 6). (** $P < 0.01$, T de Student).

Sin embargo, el análisis por citometría de flujo mostró que las células T_H17 CD69KO expresan menos AHR a nivel de proteína que las T_H17 WT, ya que aunque no hay diferencias en el porcentaje de células que expresan la proteína, la media de la intensidad de la fluorescencia del AHR es significativamente inferior en las T_H17 CD69KO (Fig. 22). Teniendo en cuenta que las células T_H17 deficientes en CD69 tienen cantidades de miR-721 mucho mayores que las T_H17 WT, una reducción en los niveles de AHR en las células CD69KO es coherente con una posible regulación del miRNA y su diana. Y el hecho de que haya una disminución en los niveles de proteína pero no de mRNA, sugiere que en el caso de que miR-721 regulara al AHR lo haría inhibiendo su traducción, método de regulación génica más habitual en animales (Wienholds and Plasterk, 2005).

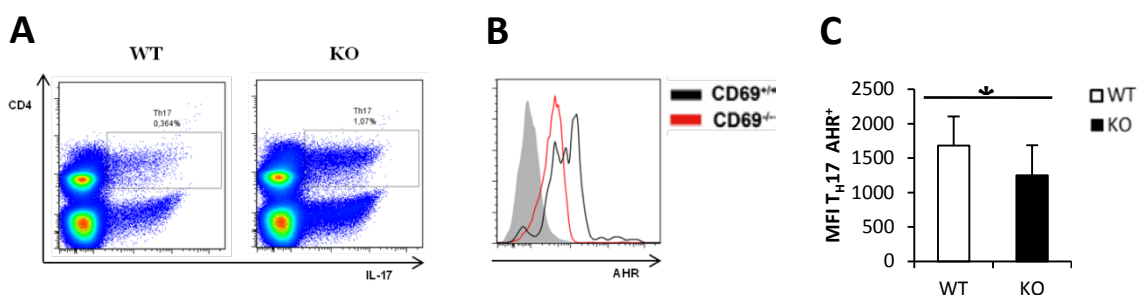


Figura 22. Expresión del AHR en linfocitos T_H17 WT y CD69KO. (a) Dot plots representativos de las células T_H17 generadas *in vivo*. (b) Histograma representativo de la expresión de AHR en linfocitos T CD4⁺ naive WT y CD69KO. (c) Cuantificación de la media de la intensidad de la fluorescencia de AHR en linfocitos T_H17 WT y CD69KO generados *in vivo* medida por citometría de flujo. Las barras de error representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes (n = 6). (** P < 0.01, T de Student).

4. Estudio de la expresión de miR-721 y miR-155 en el modelo animal de miocarditis experimental autoinmune.

Según los resultados obtenidos, los linfocitos T CD4⁺ naive, T reguladores y T_H17 deficientes en CD69 tienen alterado el patrón de expresión de diversos microRNAs. Resultados previos de nuestro grupo muestran que la molécula CD69 limita la severidad de disfunción cardíaca en el modelo de miocarditis experimental autoinmune (EAM) mediante el control de las respuestas T_H17 (Cruz-Adalia et al., 2010). Por ello, utilizamos este modelo para investigar el papel de los miRNAs anteriormente citados en esta enfermedad. El modelo murino de EAM se induce mediante la inmunización con un péptido derivado de la cadena pesada de la miosina- α (MyHC α) específica de tejido cardíaco emulsionado con el adyuvante CFA (Complete Freund's Adjuvant), lo que provoca la activación y diferenciación de las células T_H17 efectoras. Tras 21 días de la inmunización, los ratones se encuentran en la fase aguda de la enfermedad, presentando inflamación en el miocardio y anticuerpos anti-miosina cardíaca en el suero. A los 56 días aparece la fase crónica, caracterizada por la fibrosis y degeneración del miocardio y, como consecuencia, el desarrollo de cardiomiopatías.

Para validar el modelo de la EAM con un método no invasivo, la respuesta inmune generada en la fase aguda de la EAM se caracterizó 21 días después de la inmunización con el péptido MyHC α . Para ello se inyectó una sonda fluorescente intravenosa que detecta elastasa activada y por tanto neutrófilos y focos de inflamación, y se examinaron los ratones mediante tomografía molecular de fluorescencia (FMT). Con esta técnica, confirmamos que los ratones CD69KO presentaban una mayor inflamación en el corazón que los ratones WT (Fig. 23).

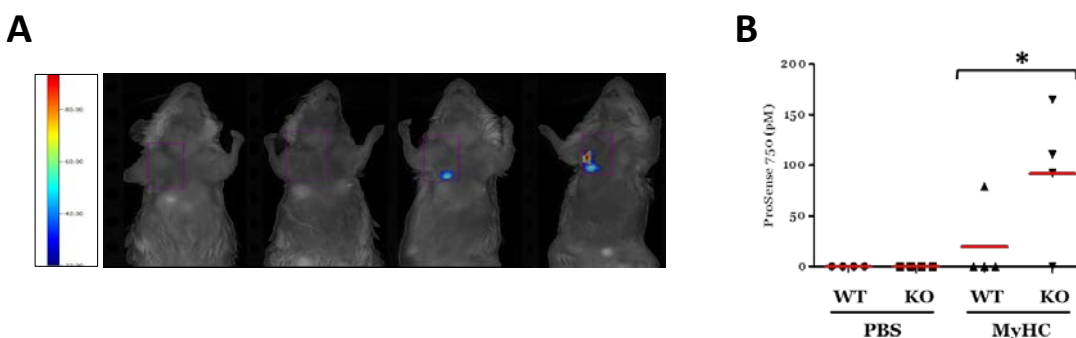


Figura 23. Los ratones CD69KO presentan inflamación exacerbada en el miocardio durante la fase aguda de la EAM. (a) Imagen de tomografía molecular de fluorescencia mostrando la infiltración de neutrófilos en el miocardio de ratones WT y CD69KO inmunizados subcutáneamente con CFA/MyHC α o CFA/PBS en el caso de los controles. (b) Intensidad de la sonda ProSense 750 FAST (que detecta elastasa activada) medida mediante tomografía molecular de fluorescencia en ratones WT y CD69KO durante la fase aguda de la EAM. Experimento representativo de un total de 3 experimentos independientes (n = 6 ratones por grupo) (* P < 0.05, T de Student).

4.1. Niveles de expresión de miRNAs en corazón.

Para investigar la expresión de los miRNAs durante la fase aguda del modelo de EAM, tras examinar la inflamación del miocardio mediante tomografía molecular de fluorescencia a día 21, se sacrificaron los ratones y se les extrajo el corazón (Fig. 24).

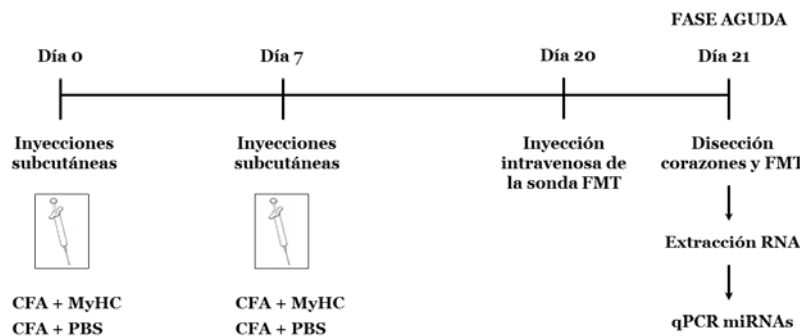


Figura 24. Modelo de miocarditis experimental autoinmune (EAM). El modelo de ratón de la EAM se induce mediante la inmunización de un péptido derivado de la cadena pesada de la miosina- α (MyHC α) emulsionado con el adjuvante CFA (Complete Freund's Adjuvant) a días 0 y 7. A los 21 días, los ratones se encuentran en la fase aguda de la enfermedad, momento en el que se sacrificaron los animales y se extrajeron los corazones para estudiar la expresión de los miRNAs presentes.

El análisis de los niveles de expresión de los miRNAs presentes en el corazón de los ratones durante la fase aguda de la EAM reveló un aumento significativo en la expresión de miR-721 en el corazón de los ratones enfermos, tanto WT como CD69KO, respecto a los ratones control. En cambio, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de miR-155 en los corazones de los animales (Fig. 25).

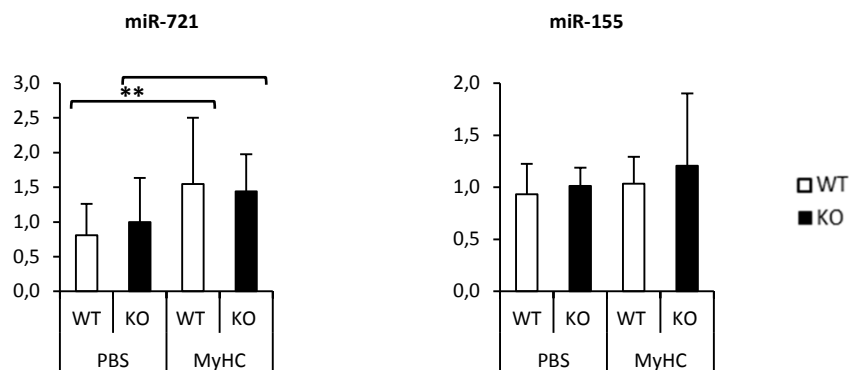


Figura 25. Niveles de expresión de miRNAs en corazón durante la fase aguda de la EAM. Expresión relativa de miR-721 y miR-155 en el corazón de ratones WT y CD69KO durante la fase aguda de la EAM

medida por qPCR. Las barras de error representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes (n = 6). (* P < 0.05, ** P < 0.01, T de Student).

4.2. Niveles de expresión de AHR y SOCS-1 en corazón.

En cuanto a la expresión a nivel de RNA mensajero de las dianas de miR-721 y miR-155 en el corazón de los ratones durante la fase aguda de la EAM, el análisis mediante qPCR no reveló ninguna diferencia significativa en los niveles totales de AHR y SOCS1 en los corazones de los ratones WT o CD69KO, controles o tratados con el péptido inductor de la miocarditis (Fig. 26).

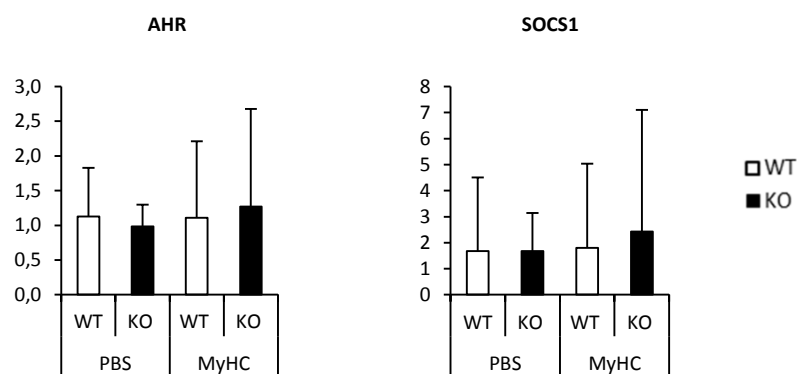


Figura 26. Niveles de mRNA de AHR y SOCS1 en corazón durante la fase aguda de la EAM. Expresión relativa de AHR y SOCS1 a nivel de mRNA en el corazón de ratones WT y CD69KO durante la fase aguda de la EAM medida por qPCR. Las barras de error representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes (n = 6). (* P < 0.05, ** P < 0.01, T de Student).

También se cuantificaron mediante western blot los niveles de expresión de AHR y SOCS1 en el corazón de los animales durante la fase aguda de la EAM, encontrándose una tendencia estadísticamente no significativa en la que los ratones con miocarditis presentan niveles menores de las proteínas AHR y SOCS1 que los ratones sanos, y dentro de éstos, los ratones CD69KO menos aún que los ratones WT (Fig 27). El AHR por lo tanto estaría posiblemente inhibido en los corazones donde hay más expresión de miR-721, lo que podría indicar su regulación en EAM por este miRNA.

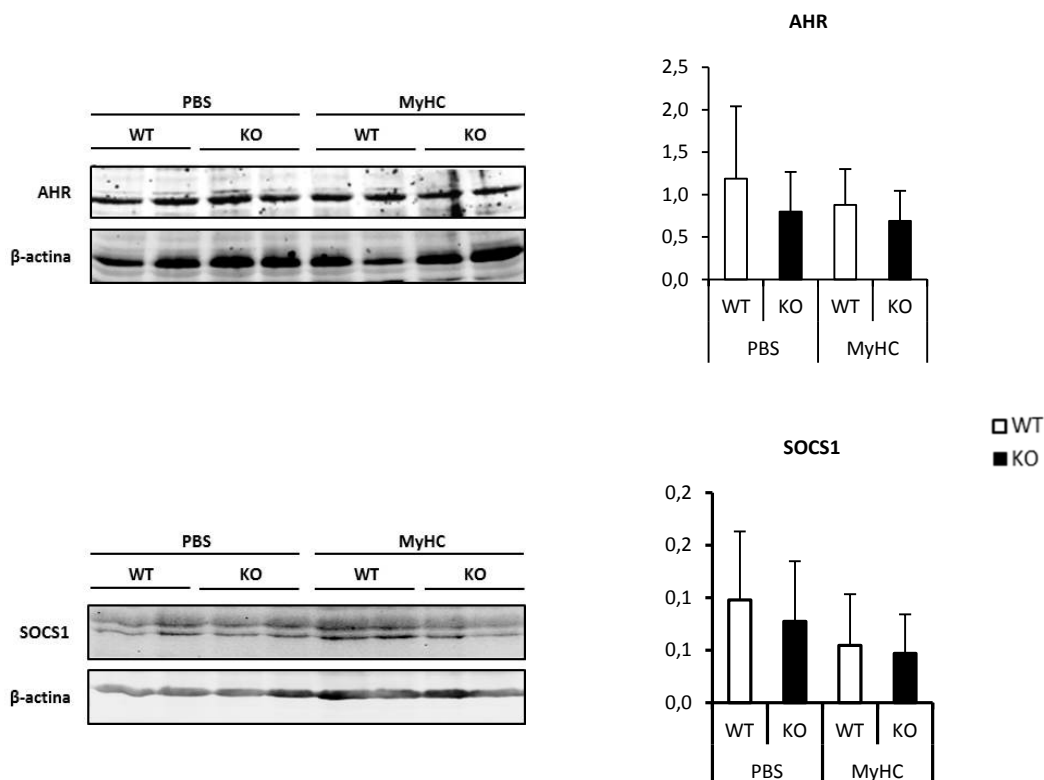


Figura 27. Niveles de expresión de las proteínas AHR y SOCS1 en corazón durante la fase aguda de la EAM. Niveles de expresión de AHR y SOCS1 analizados por western blot en el corazón de ratones WT y CD69KO aislados en la fase aguda de la EAM. Las barras de error representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes (n = 6). (* $P < 0.05$, T de Student).

4.3. Niveles de expresión de miRNAs en suero.

Con el objetivo de encontrar un microRNA detectable en sangre que pueda servir como biomarcador diagnóstico, como marcador de la severidad de la miocarditis y/o como diana terapéutica de la enfermedad, se estudió el patrón de expresión de miRNAs en el suero de ratones con miocarditis autoinmune experimental. Para ello se extrajo sangre de los ratones durante la fase aguda de la EAM y se analizaron los niveles de miRNAs presentes en el suero mediante PCR cuantitativa. El resultado obtenido fue un aumento significativo de miR-721 y miR-155 en el suero de los ratones enfermos respecto a los animales control. Además se encontró que los ratones CD69KO con miocarditis expresaban más miR-721 en suero que los WT tratados con el péptido MyHC y que los controles, sugiriendo que este miRNA podría estar, en efecto, relacionado con un incremento en T_H17 y por tanto con la severidad de la enfermedad (Fig. 28).

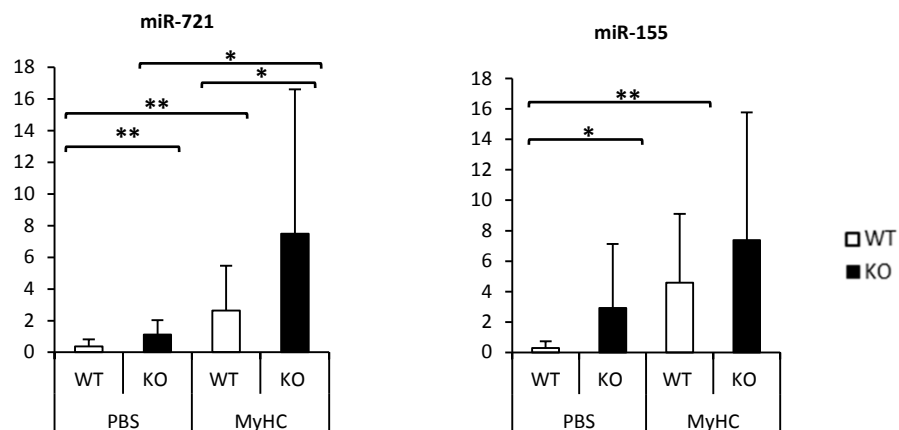


Figura 28. Niveles de expresión de miRNAs en suero durante la fase aguda de la EAM. Expresión relativa de miR-721 y miR-155 en el suero sanguíneo de ratones WT y CD69KO durante la fase aguda de la EAM medida por qPCR. Las barras de error representan la media \pm SD (n = 6). (* P < 0.05, ** P < 0.01, T de Student).

5. Análisis de linfocitos T_H17, células T reguladores y expresión de miRNAs en plasma de pacientes con cardiomiopatías.

La miocarditis está caracterizada por la infiltración de células inflamatorias en el miocardio. Tras el proceso agudo, se produce una pérdida de cardiomiocitos y el desarrollo de fibrosis y necrosis en el miocardio, pudiendo aparecer remodelamiento de los ventrículos, disfunción permanente de la pared ventricular, cardiomiopatía dilatada, fallo cardíaco y arritmias. Con el objetivo de estudiar el papel de los linfocitos T CD4⁺ en el desarrollo de la enfermedad en humanos y su potencial como dianas terapéuticas, se analizaron estas poblaciones en la sangre de pacientes con miocarditis y cardiomiopatías dilatadas en comparación con donantes sanos. Además, se midieron los niveles de expresión de los microRNAs detectados en el modelo animal de miocarditis experimental autoinmune en el plasma sanguíneo de los pacientes y los sujetos control, para buscar un miRNA detectable en sangre que pudiera servir como biomarcador diagnóstico y/o como diana terapéutica de la enfermedad.

5.1. Análisis de linfocitos T CD4⁺ totales en sangre de pacientes.

Para cuantificar el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ totales circulantes en la sangre de los pacientes y los controles, se aislaron linfocitos de sangre periférica anticoagulada con EDTA mediante un gradiente de densidad y se analizaron sus marcadores de membrana por citometría de flujo. El análisis reveló un aumento estadísticamente significativo en la proporción de células T CD4⁺ totales en la sangre de los pacientes con miocarditis aguda o takotsubo respecto a la de los sujetos sanos (Fig. 29).

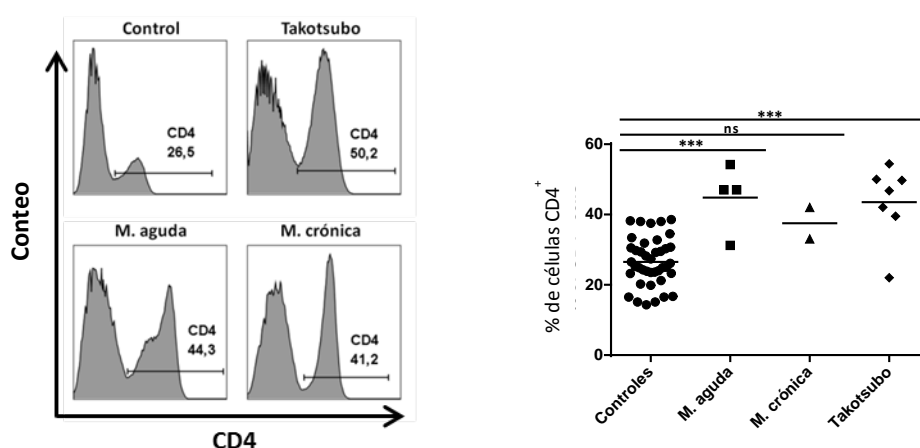


Figura 29. Análisis de linfocitos T CD4⁺ totales en sangre de pacientes con cardiomiopatías. Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ totales presentes en la sangre de sujetos sanos y pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica o cardiomiopatía de takotsubo analizados por citometría de flujo. (ns = diferencias no significativas, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, Análisis de varianza (ANOVA) de un factor).

5.2. Análisis de linfocitos T_H17 en sangre de pacientes.

Para analizar los porcentajes de células T_H17 se aislaron los linfocitos de sangre periférica mediante un gradiente de densidad, se activaron con anti-OKT3, se reestimularon PMA, ionomicina y brefeldina y se marcaron con anti-CD4 y anti-IL-17. El análisis por citometría de flujo mostró que dentro de las células T CD4⁺ totales, los porcentajes de linfocitos T_H17 en la sangre de los pacientes con miocarditis crónica o cardiomiopatía de takotsubo son similares a los de los controles sanos, mientras que los pacientes con miocarditis aguda presentan una proporción de linfocitos T_H17 en sangre significativamente superior a la de los voluntarios sanos (Fig. 30), indicando que las respuestas T_H17 podrían ser específicas de la fase aguda de esta enfermedad.

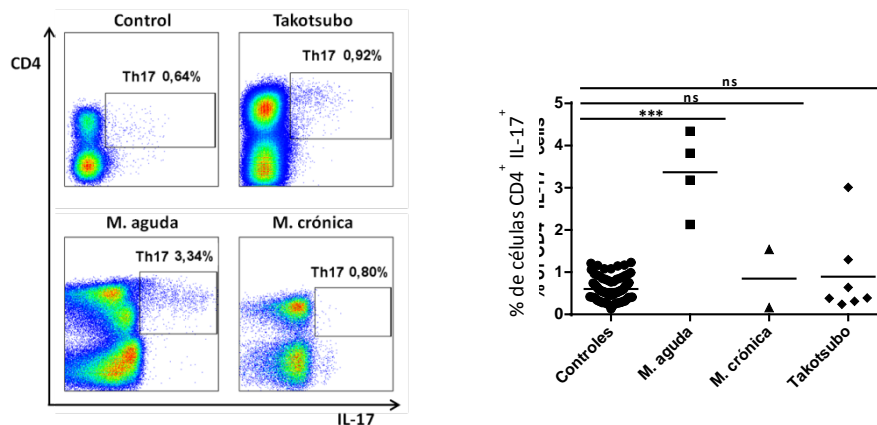


Figura 30. Análisis de linfocitos T_H17 en sangre de pacientes con miocarditis y cardiomiopatías dilatadas. Porcentajes de linfocitos T_H17 relativo a las células T CD4⁺ totales presentes en la sangre de sujetos sanos y pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica o cardiomiopatía de takotsubo analizados por citometría de flujo. (ns = diferencias no significativas, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, Análisis de varianza (ANOVA) de un factor).

5.3. Análisis de linfocitos Tregs naïve y de memoria en sangre.

El análisis de los porcentajes de las células T reguladoras presentes en la sangre de enfermos de miocarditis y cardiomiopatías dilatadas englobó el estudio de las células Tregs totales, de las células Tregs naïve y de las células Tregs de memoria. Para ello se activaron con OKT3 los linfocitos extraídos de la sangre y se analizaron las poblaciones CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (Tregs totales), CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ (Tregs naïve) y CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ CD45RA⁻ CD45RO⁺ (Tregs de memoria). El resultado obtenido fue que los pacientes con takotsubo no presentan diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de células

T reguladoras en sangre periférica respecto a los voluntarios sanos. Sin embargo, los pacientes con miocarditis tanto aguda como crónica presentan unos porcentajes de células Treg totales significativamente inferiores a los de los sujetos control, debida probablemente a una significativa reducción de la población de Treg de memoria en estos pacientes, ya que la población de células Treg naive no está afectada en estos pacientes. (Fig. 31).

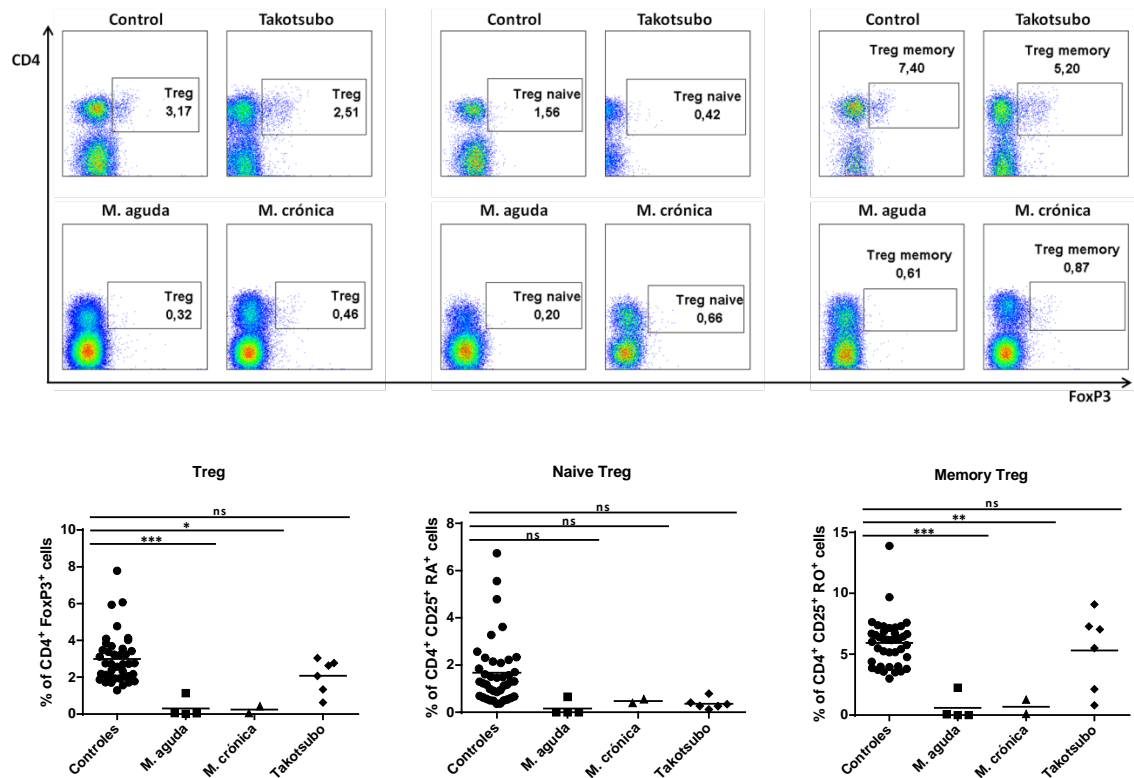


Figura 31. Análisis de linfocitos **Tregs en sangre de pacientes con miocarditis y cardiomiopatías dilatadas.** Porcentajes de linfocitos Tregs totales, Tregs naive y Tregs de memoria presentes en la sangre de sujetos sanos y pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica o cardiomiopatía de takotsubo analizados por citometría de flujo. (ns = diferencias no significativas, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Análisis de varianza (ANOVA) de un factor).

5.4. Niveles de expresión de miRNAs en el plasma sanguíneo.

Por último, con el fin de validar nuestro estudio en los pacientes con cardiopatías, realizamos un análisis de los niveles de expresión de los miRNAs detectados en el modelo murino de EAM, en el plasma sanguíneo de sujetos sanos y enfermos con miocarditis aguda, miocarditis crónica y síndrome de takotsubo extrayendo el RNA total y cuantificando su expresión mediante qPCR. La tendencia observada fue un aumento en los niveles de expresión de miR-155 y sobre todo miR-721 en los pacientes con cardiomiopatías respecto a los sujetos sanos, mayor en los pacientes con miocarditis aguda que en los que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad y especialmente en los pacientes con takotsubo (Fig. 32).



Figura 32. Niveles de expresión de miRNAs en el plasma sanguíneo de pacientes con miocarditis y cardiomiopatías dilatadas. Expresión relativa de miR-155 y miR-721 en el plasma sanguíneo de sujetos sanos y pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica y síndrome de Takotsubo medida por qPCR. Las barras de error representan la media \pm SD (Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor).

DISCUSIÓN

1. Papel de CD69 en el desarrollo de las células Tregs naturales y en la diferenciación, el fenotipo y la funcionalidad de las células Tregs inducibles

En los últimos años varios estudios en modelos animales de enfermedades inflamatorias realizados en ratones deficientes en CD69 han puesto de manifiesto el papel de esta molécula como regulador negativo de la respuesta inmune. La deficiencia de CD69 en el compartimento linfocitario incrementa la inflamación en los modelos animales de artritis inducida por colágeno, asma alérgico, dermatitis por contacto, miocarditis autoinmune y colitis (Cruz-Adalia et al., 2010; Martin et al., 2010b; Radulovic et al., 2012; Radulovic et al., 2013; Sancho et al., 2003). Además, estudios moleculares han demostrado que CD69 inhibe la diferenciación y función de las células T_H17 , así como la función supresora de las Tregs, en un proceso dependiente de la activación de la vía de señalización Jak3/Stat5 (Cortes et al., 2014; Martin et al., 2010a; Martin and Sanchez-Madrid, 2011). Así, CD69 funciona como un modulador negativo de las respuestas inmunológicas mediadas por células T regulando el balance entre los linfocitos T reguladores y los T_H17 , y entre las citoquinas pro- y anti-inflamatorias, tanto en la homeostasis como en la inflamación (Martin and Sanchez-Madrid, 2011).

En cuanto a los ligandos de CD69, se ha descrito recientemente por nuestro grupo que la Galectina-1, cuando se expresa en determinadas subpoblaciones de células dendríticas, se une a CD69 modulando la diferenciación y función de las células T_H17 en ratón y humano (de la Fuente et al., 2014). Y más recientemente se ha descrito que el complejo de proteínas que unen calcio S100A8/S100A9 o calgranulina A y B, expresadas constitutivamente y secretadas por células mieloides incluyendo granulocitos, monocitos y DCs, es también un ligando soluble de CD69. La unión de CD69 al complejo S100A8/S100A9 regula la expresión de SOCS3 inhibiendo la vía de señalización de STAT3, al mismo tiempo que podría aumentar la secreción de TGF- β promoviendo la diferenciación de las células Treg. Por otro lado, esta unión reduce la producción de la citoquina IL-4 en las PBMCs (Lin et al., 2015). Estos trabajos ponen de manifiesto el interés creciente por este campo en los últimos años desde que la molécula CD69 ha sido ligada al grupo de moléculas que regula los procesos anti-inflamatorios.

La expresión del receptor de esfingolípidos $S1P_1$ es necesaria para que los linfocitos puedan salir de los órganos linfoides (timo, nódulos linfáticos...) a través de los vasos linfáticos en respuesta a diferentes estímulos (Matloubian et al., 2004). CD69 controla la expresión de este receptor mediante el dominio helicasa 4 de membrana de $S1P_1$, facilitando su internalización y degradación y, por tanto, regula la salida de los linfocitos de los órganos linfoides (Bankovich et al., 2010; Shiow et al., 2006). Además el receptor $S1P_1$ es un antagonista de la generación de Tregs en el timo así como de su homeostasis y función supresora en periferia (Liu et al., 2009).

Por ello, para conocer mejor el papel de CD69 en los linfocitos T reguladores, en este trabajo se investigó su contribución al desarrollo de las células nTregs y a la diferenciación, fenotipo y funcionalidad de las células iTregs. Dicho estudio en ratones deficientes en CD69 revela que la ausencia de CD69 no afecta a la proporción de timocitos CD4SP totales pero reduce significativamente la población de células nTregs en el timo. Los resultados obtenidos en cultivos organotípicos de timos fetales confirman que la expresión de CD69 en los timocitos es crítica para la generación de las células nTregs. Este hallazgo es coherente con la evidencia previa de que la diferenciación de las células Treg en el timo humano está ligada a la expresión de CD69, ya que las células dendríticas plasmacitoides son capaces de inducir la diferenciación de timocitos $CD4^+CD8^+CD69^{high}$ en células nTreg $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ (Martin-Gayo et al., 2010).

Se han descrito numerosos tipos de Tregs en relación a la expresión de ciertos marcadores. En este sentido, además de las nTreg $CD4^+Foxp3^+CD25^{high}$, se han caracterizado otras poblaciones de células Treg. Por ejemplo, se ha descrito una población de células Treg humanas $CD4^+LAP^+CD69^+$ (LAP, *latency-associated peptide*, es una forma de TGF- β unida a la membrana) en sangre periférica que no expresan FoxP3 pero sí el receptor tipo II de TGF- β y CD69, que al activarse secretan IL-8, IL-9, IL-10, IFN- γ y TGF- β , y que *in vitro* muestran una capacidad supresora dependiente de TGF- β e IL-10 (Gandhi et al., 2010). También se han caracterizado las Treg presentes en los órganos linfoides secundarios humanos, observando que a diferencia de las Treg presentes en sangre y médula ósea que muestran un fenotipo anérgico, la mayoría de las Treg $CD4^+CD25^+CD127^+FoxP3^+$ presentes en los órganos linfoides secundarios son células $CD69^+CD45RA^-$ activadas policlonalmente con una capacidad supresora similar, pero que producen IL-2 y tienen mayor capacidad proliferativa *ex vivo* (Peters et al., 2013). Además, recientemente se ha descrito en donantes sanos, una población de Tregs $CD69^+NKG2D^+LAP^+$ en sangre, que expresa TGF- β e IL-10 y que tiene unas excepcionales propiedades supresoras de la activación y proliferación de células T efectoras (Vitales-Noyola et al., 2015).

Nuestros resultados muestran que la deficiencia en CD69 no altera la proporción de células Tregs en los órganos linfoides secundarios de los ratones, ni su diferenciación *in vitro* o su fenotipo, en cuanto a la expresión de distintos marcadores. Tampoco se observaron diferencias de expresión en el factor de transcripción FoxP3, ni de TGF- β e IL-2, pero sí una expresión disminuida de IL-10 tanto a nivel de mRNA como de proteína de las iTregs CD69KO. Esto es coherente con una inhibición de la capacidad supresora de los linfocitos T efectoras en comparación con las iTreg WT, probablemente como consecuencia de la reducción en los niveles de expresión de la IL-10.

Estos resultados corroboran el importante papel del receptor CD69 en el control de las respuestas inmunológicas mediadas por linfocitos T y apoyan observaciones previas que sugerían su implicación en la función de las células T reguladoras. Se ha visto que cuando las células Treg son activadas *in vitro* con células dendríticas alogénicas o células madre mesenquimales, se convierten en células CD69⁺ y ejercen una potente función supresora (Saldanha-Araujo et al., 2012). En pacientes con la enfermedad de Chagas, la exposición *in vitro* de linfocitos a antígenos de *Trypanosoma cruzi* también resultan en el aumento de la expresión de CD69 por células Treg CD4⁺CD25^{high} (de Araujo et al., 2011). En pacientes con esclerosis sistémica la baja expresión de CD69 en los linfocitos Treg CD4⁺CD25^{high} está asociada con una función supresora y una síntesis de TGF-β deficientes (Radstake et al., 2009). En cuanto al papel de CD69 en linfocitos de ratón, la ausencia de CD69 en linfocitos T CD4⁺ afecta la tolerancia oral y reduce el potencial de diferenciación de las células Treg FoxP3⁺ en respuesta a antígenos orales (Radulovic et al., 2012). Finalmente, nuestro grupo ha demostrado que las células Treg requieren de la expresión de CD69 para mantener la tolerancia inmunológica y prevenir la inflamación (Cortes et al., 2014). Aunque en homeostasis existen Treg tanto CD69⁺ como CD69⁻, sólo las Treg FoxP3⁺CD69⁺ expresan altos niveles de los marcadores de supresión CTLA-4, ICOS, CD38 y GITR, secretan grandes cantidades de TGF-β y tienen capacidad supresora de las células T efectoras, la cual está regulada por la activación de la vía de señalización de STAT5 y la inhibición de la MAP Kinasa ERK (Cortes et al., 2014).

2. Regulación de la expresión de miRNAs mediada por CD69 en los linfocitos T_H17 y las células T reguladoras

Desde que en 1993 se describiera por primera vez la existencia de un RNA pequeño no codificante con capacidad reguladora en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993), se han publicado miles de artículos describiendo los mecanismos del RNA de interferencia y las múltiples funciones que los miRNAs desempeñan en la regulación de la expresión génica. El número de miRNAs registrados en la base de datos miRBase hasta la última actualización asciende a 35.828 miRNAs maduros en 223 especies (www.mirbase.org, versión 21). Ahora sabemos que los miRNAs desempeñan un papel crítico en la regulación del sistema inmune, tanto a nivel de inmunidad adaptativa como a nivel de inmunidad innata, controlando la diferenciación de muchos tipos celulares y sus funciones inmunológicas.

Uno de los muchos ejemplos de miRNAs implicados en la regulación del balance entre la tolerancia y la inmunidad es miR-155. Varios estudios han demostrado que miR-155 controla la diferenciación de las células T CD4⁺ en células efectoras T_H1, T_H2 y T_H17 (O'Connell et al.,

2010; Rodriguez et al., 2007; Vigorito et al., 2007) y que afecta al desarrollo de las células Treg (Kohlhaas et al., 2009; Lu et al., 2009). MiR-155 regula la tolerancia mediada por las nTregs mediante el control de la susceptibilidad de las células T_H $CD4^+$ convencionales humanas y murinas ante la supresión mediada por nTreg (Stahl et al., 2009). En un interesante estudio se ha descrito que la adición de cantidades fisiológicas de exosomas enriquecidos en miR-155 a la leche infantil durante el primer año de vida, previene el desarrollo de enfermedades atópicas en los niños e incrementa su número de células Treg (Melnik et al., 2014). En enfermedades como el lupus, miR-155 está sobre-expresado en las Tregs reduciendo la expresión de CD62L y por lo tanto confiriendo un fenotipo alterado a estas células en la enfermedad. Además, la deficiencia en Dicer en Tregs sugiere un mecanismo independiente de Dicer en la regulación de los miRNAs en condiciones de inflamación (Divekar et al., 2011).

En nuestro grupo, investigamos el papel de CD69 en funciones inmunoregulatoras a través de la regulación de la expresión de miRNAs en los linfocitos T_H17 y T reguladores. En este sentido, aunque la expresión del miR-155 está alterada en el análisis por microarray, los linfocitos deficientes de CD69 no muestran diferencias consistentes en sus niveles de expresión por qPCR. En cambio, sí hemos encontrado diferencias significativas en la expresión de miR-721 en nuestro estudio. En este estudio hemos observado que las células $CD4^+$ naïve CD69KO expresan más miR-721 que las células $CD4^+$ naïve WT, pero en niveles muy inferiores a los de los linfocitos efectores. MiR-721 parte de un nivel de expresión basal mínimo en los linfocitos T $CD4^+$ naïve y su expresión aumenta cuando la célula se polariza, siendo este aumento moderado en Tregs y muy acentuado en T_H17 . Al igual que en las células $CD4^+$ naïve, la expresión de miR-721 en las T_H17 es mucho mayor en ausencia de CD69, mientras que en las Treg ocurre lo contrario. Estos datos sugieren que CD69 regula la expresión del microRNA miR-721 en las células T $CD4^+$ y en su diferenciación a T_H17 y células T reguladoras. Sin embargo, existe muy poca información en la bibliografía sobre este miRNA y su función en el sistema inmune se desconoce por completo.

MiR-721 fue identificado por primera vez en 2006 en el sistema nervioso central de embriones de ratón (Wheeler et al., 2006) y posteriormente fue descrito en embriones preimplantados también de ratón (Yang et al., 2008b). Debido a su homología de secuencia, Este miRNA pertenece a la familia de miRNAs miR-130/301/721 y respecto a su función, se ha descrito que estimula la generación de células madre pluripotentes inducibles IPS a través de la represión del factor de transcripción Meox2 (Pfaff et al., 2011). Aunque aún queda mucho trabajo por hacer, el estudio de este miRNA, prácticamente desconocido hasta el momento, puede ser relevante para la inmunidad adaptativa teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio.

3. Estudio de las posibles dianas reguladas por miR-721 y miR-155

En este estudio hemos descrito que en ausencia de CD69, los linfocitos T CD4⁺ naive, T_H17 y Treg tienen alterados sus niveles de expresión de miR-721, así como de una de sus dianas predictivas, el AHR. Este factor de transcripción juega un papel clave en la diferenciación y función de las células T, B, $\gamma\delta$, etc (Quintana, 2013). AHR se expresa en T_H17 y Treg ejerciendo distintas funciones, antagónicas en algunos casos, en función del ligando disponible en el ambiente inflamatorio concreto. La activación del AHR por su ligando 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) induce células Treg funcionales capaces de suprimir la inflamación en el modelo de encefalomiелitis experimental autoinmune; mientras que la activación del receptor por el ligando 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) interfiere en el desarrollo de las Treg, promueve la diferenciación de las T_H17 e incrementa la severidad de la EAE en ratón (Quintana et al., 2008). En este sentido, se ha descrito la implicación de un grupo de miRNAs en la regulación mediada por AHR en un estudio en el que se demuestra que en condiciones de polarización hacia T_H17, pero no a Treg, la activación de AHR aumenta la expresión de miR-132/212 promoviendo la diferenciación de las células T_H17 (Nakahama et al., 2013). El ligando de AHR endógeno, FICZ, reduce la inflamación en las lesiones cutáneas de pacientes con psoriasis, mientras que los antagonistas de AHR aumentan la inflamación (Di Meglio et al., 2014). Del mismo modo, la vía de señalización de AHR a través de su ligando endógeno FICZ reduce la respuesta inflamatoria en el modelo de inflamación cutánea inducido por imiquimod y los ratones deficientes en AHR exhiben una exacerbación sustancial de la enfermedad en comparación con los ratones WT (Di Meglio et al., 2014). Otro trabajo publicado recientemente describe un programa metabólico controlado por los factores de transcripción AHR y HIF1- α (factor inducible por hipoxia-1) que promueve la diferenciación de las células T reguladoras de tipo 1 (Tr1), secretoras de IL-10 (Mascanfroni et al., 2015). HIF1- α controla la reprogramación metabólica temprana de las células Tr1. Posteriormente, AHR promueve la degradación de HIF1- α y toma el control del metabolismo de las células Tr1. El ATP extracelular (eATP) y la hipoxia, vinculados a la inflamación, desencadenan la inactivación del AHR por HIF1- α e inhiben la diferenciación de las Tr1. Por el contrario, CD39 promueve la diferenciación de las Tr1 agotando el eATP y contribuye a la capacidad supresora de las Tr1 mediante la generación de adenosina en colaboración con el CD73 expresado por las células T respondedoras y las APCs. Estos resultados sugieren que HIF1- α y AHR integran señales inmunológicas, metabólicas y ambientales para regular la respuesta inmune (Mascanfroni et al., 2015).

En ausencia de CD69, se observa una disminución de la expresión de AHR en los linfocitos T_H17 a nivel de proteína pero no de mRNA, sugiriendo que miR-721 podría estar regulando su expresión en los linfocitos T_H17 mediante la inhibición de su traducción, el método de regulación génica más habitual en animales. Nuestros datos aportan una información muy reveladora en el papel de CD69 controlando la expresión de miR-721 en los linfocitos T $CD4^+$ naive, T_H17 y Treg, postulándose como una importante molécula reguladora del balance entre las células T_H17 y Treg a través de la expresión de AHR.

MiR-155 controla la respuesta inmunitaria y la inflamación tanto a través de la inmunidad innata como de la adaptativa (Seddiki et al., 2014). En la inmunidad adaptativa, miR-155 es esencial para la correcta diferenciación de las células B y la producción de anticuerpos (Rodriguez et al., 2007; Vigorito et al., 2007); regula las células T $CD8^+$ (Lind et al., 2013; Tsai et al., 2013); controla la diferenciación de las células T $CD4^+$ en células efectoras T_H1 , T_H2 y T_H17 (O'Connell et al., 2010; Rodriguez et al., 2007; Vigorito et al., 2007); y contribuye al desarrollo de las células T reguladoras (Kohlhaas et al., 2009; Lu et al., 2009). miR-155 promueve el desarrollo de los linfocitos T_H17 , por lo que los ratones deficientes en miR-155 son más resistentes a desarrollar la enfermedad en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (O'Connell et al., 2010). Además, las células T_H17 miR-155^{-/-} no inducen EAE cuando son transferidas exógenamente y no son capaces de responder correctamente a la IL-23 (Hu et al., 2013). Otros tres estudios demuestran que la producción de IL-17A por las células T_H17 está regulada positivamente por miR-155 (Murugaiyan et al., 2011; O'Connell et al., 2010; Yao et al., 2012). Recientemente se ha descrito que STAT3 regula la expresión de miR-155 en las células T_H17 , promoviendo su expansión y la generación de uveitis experimental autoinmune (Escobar et al., 2013). Las funciones de miR-155 también han sido estudiadas en la mucosa del intestino, encontrándose un papel dependiente de TGF- β en la modulación de las citoquinas y la respuesta inmune (Das et al., 2013). Validando la predicción bioinformática de que la quinasa de células T inducible (itk) es una diana de miR-155, los autores demuestran que la sobreexpresión de miR-155 en las células T $CD4^+$ de la lámina propia reduce la expresión de itk a nivel de mRNA, provocando un ligero descenso en la expresión de IL-2. De allí que sugieran que un exceso de miR-155 en presencia de TGF- β pueda contribuir a la tolerancia oral (Das et al., 2013). En pacientes con síndrome coronario agudo se ha visto que el patrón de expresión alterado de miR-155 correlaciona con la diferenciación de las células T_H17 (Yao et al., 2011).

MiR-155 es una diana de FoxP3. Varios estudios muestran que los ratones deficientes en BIC (el gen huésped en cuyo promotor se encuentra el precursor de miR-155) o en el propio miR-155 presentan un número reducido de células Treg tanto en el timo como en la periferia, debido

a un defecto en su desarrollo (Kohlhaas et al., 2009). Sin embargo, miR-155 parece no jugar ningún papel en la función de las células Treg, ya que otros tres estudios no han encontrado diferencias significativas en la producción de IL-10 ni TGF- β por las Treg al modular los niveles de miR-155 (Murugaiyan et al., 2011; O'Connell et al., 2010; Yao et al., 2012). La ausencia de miR-155 en las células Treg resulta en un aumento de la expresión de SOCS1, inhibidor de la activación del factor de transcripción STAT5, lo que lleva a una reducida proliferación de las células Treg (Lu et al., 2009). Por tanto, miR-155 favorece la homeostasis de las células Treg a través de la inhibición de SOCS1 (Lu et al., 2009). Yao *et al.* han mostrado que miR-155 contribuye a la activación de las rutas de señalización IL-2/STAT5 e IL-6/STAT3 y a la diferenciación de las células T_H17 y Treg. Los autores sugieren que miR-155 podría estar involucrado en la modulación de la inflamación al menos en parte a través de la regulación de SOCS1 (Yao et al., 2012). En este sentido, no se observaron cambios en los niveles de expresión de SOCS1 medidos mediante qPCR o WB en Tregs o T_H17, por lo que en este estudio no hemos confirmado la hipótesis de que CD69 regule miR-155, implicado en la inhibición de SOCS1.

4. Papel de los miRNAs mediado por CD69 en el modelo animal de miocarditis experimental autoinmune

Nuestro grupo describió previamente que, en este modelo de inflamación mediado por las células T_H17, CD69 limita la severidad de la cardiomiopatía (Cruz-Adalia et al., 2010). En el presente estudio mostramos un aumento de la expresión de miR-721 en el miocardio durante la fase aguda de la EAM. Este resultado apoyaría la hipótesis de que los ratones con miocarditis tienen un mayor contenido en células T_H17, con alta expresión de miR-721, durante la fase aguda de la EAM. El hecho de que no se encontraran diferencias significativas en la expresión de miR-721 entre el lisado total de corazones de ratones WT versus CD69KO con EAM, podría deberse a que las células T_H17 representan un pequeño porcentaje en el conjunto de todas las células del corazón y puede deberse a limitaciones de la técnica. Por el mismo razonamiento y más aún si tenemos en cuenta que AHR se expresa en distintos tipos celulares (Harrill et al., 2013), incluidos los cardiomiocitos (Wang et al., 2013), no se encontraron diferencias significativas, aunque sí una tendencia a la baja en la expresión global de AHR en los corazones de los ratones enfermos en el modelo de EAM. Esta tendencia correlaciona con la posible regulación de AHR por miR-721 mediada por CD69 en este modelo.

El papel de los miRNAs en la miocarditis humana no está totalmente dilucidado. Hasta el momento sólo se han identificado un par de miRNAs que pueden ser correlacionados con la

miocarditis viral, especialmente durante la fase aguda de la miocarditis. Se trata de los miRNAs miR-208b y miR-499, cuya expresión se encuentra aumentada en pacientes con miocarditis viral y pueden detectarse en el plasma de pacientes con miocarditis (Corsten et al., 2010). MiR-208b se expresa en los cardiomiocitos y está implicado en procesos patológicos tales como el crecimiento cardíaco, la fibrosis, la inflamación provocada por el aumento de expresión de MHC y el desfavorecimiento del remodelado cardíaco (Kukreja et al., 2011). MiR-499 también se expresa en los cardiomiocitos y se sobreexpresa durante la enfermedad cardíaca (Matkovich et al., 2012). Ambos miRNAs están presentes en el daño miocárdico y pueden ser potencialmente utilizados en el diagnóstico de la miocarditis para determinar la gravedad de la enfermedad (Corsten et al., 2010). Niveles elevados de miR-499 pueden detectarse en todos los pacientes, mientras que la expresión tanto de miR-208b como de miR-499 solamente se encuentra en la miocarditis fulminante inducida por el virus (Corsten et al., 2010). Sin embargo, estos miRNAs no son específicos de la miocarditis aunque probablemente reflejen lesiones del miocardio en general, como se observó en pacientes con síndrome agudo coronario (Oerlemans et al., 2012).

La investigación actual se centra en la detección de miRNAs en las diferentes etapas de la miocarditis para identificar miRNAs involucrados en la patogénesis de la enfermedad (van den Hoogen et al., 2015). Así se ha identificado un perfil de miRNAs expresados en el miocardio e involucrados en la fase viral aguda y en la fase inflamatoria de la miocarditis aguda en pacientes con miocarditis. El estudio de Corsten et al. mostró que miR-155 está sobreexpresado en el tejido cardíaco de pacientes con miocarditis aguda, principalmente en el infiltrado de macrófagos y linfocitos T, y en el tejido cardíaco de tanto de humanos como de ratones con miocarditis viral inducida, contribuyendo a la respuesta inflamatoria contra la infección viral en el corazón (Corsten et al., 2012; Sun and Feinberg, 2012). MiR-155 es conocido por su papel proinflamatorio en múltiples procesos y por expresarse en las células inflamatorias, especialmente durante la fase inflamatoria aguda de la miocarditis (Heymans et al., 2013). En modelos murinos de miocarditis viral inducida, el bloqueo de miR-155 mediante el uso de antagonistas atenúa la inflamación cardíaca y reduce la necrosis (Heymans et al., 2013). Estos resultados indican que miR-155 juega un importante papel en la respuesta inflamatoria a la miocarditis inducida por virus. Además de miR-155, miR-21 y miR-146b también se encuentran sobreexpresados en pacientes con miocarditis y tienen un rol central en la activación inmunológica y en la inflamación (Corsten et al., 2012). El silenciamiento de estos miRNAs mediante inhibidores específicos mostró una fuerte atenuación de la miocarditis en ratones con miocarditis viral inducida (Liu et al., 2013). Todavía no se ha dilucidado la función exacta que desempeñan estos miRNAs en la patología de la miocarditis, pero se ha demostrado que existe una correlación entre la expresión de miR-21 y miR-146b y la expresión de la IL-17 (Liu et al.,

2013). Estos hallazgos sugieren que miR-21 y miR-146b participan en la regulación de la diferenciación de las células T_H17 y de ese modo controlan la autoinmunidad. La función de ROR γ t, un factor de transcripción de la diferenciación de las T_H17, se ve reforzada por el aumento de la expresión de estos miRNAs, lo que conduce a la diferenciación de las células T maduras en T_H17 (Liu et al., 2013). Por otra parte, miR-21 también está implicado en la fibrosis intersticial y en la hipertrofia cardíaca (Schroen and Heymans, 2012), aunque otros estudios han mostrado resultados contradictorios al observar una disminución significativa de los niveles de expresión de miR-21. La expresión de miR-21 en el miocardio de ratones con miocarditis provocada por el virus Coxsackie B3 (CVB3) se redujo de manera significativa y se encontró una correlación negativa entre la gravedad de la miocarditis y la expresión de miR-21 (He et al., 2013). Cuando se trataron los ratones con precursores de miR-21, la miocarditis se alivió y se redujo la apoptosis, lo que indica que miR-21 también tiene un papel protector mediante la regulación de la apoptosis mediada por la muerte celular programada 4 (PDC4) (He et al., 2013). Sobre la base de los diferentes resultados de estos estudios, cabe pensar que la función de miR-21 en la miocarditis dependa de la expresión temporal y espacial de sus dianas.

En el estudio de Corsten et al. se han encontrado otros miRNAs cuya expresión aumenta en pacientes con miocarditis viral aguda, miR-511 y miR-212 (Corsten et al., 2012). MiR-511 funciona como regulador positivo de la señalización del Toll Like Receptor-4 (TLR), mientras que miR-212 está involucrado en las respuestas hipertróficas de los cardiomiocitos (Corsten et al., 2012; Tserel et al., 2011). Y también se han descrito miRNAs involucrados en la regulación de la miocarditis, cuya expresión en lugar de aumentar, disminuye. Los miRNAs antiinflamatorios miR-106a y miR-93 reducen su expresión durante la fase aguda de la miocarditis humana (Corsten et al., 2012); y ambos están implicados en las respuestas antiinflamatorias mediante la inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias (Schroen and Heymans, 2012; Zhu et al., 2013).

Dado que la mayoría de las investigaciones hechas hasta el momento se han centrado en los miRNAs implicados en la fase aguda de la miocarditis, sabemos menos sobre los miRNAs implicados en la fase crónica de la enfermedad. Los miRNAs inflamatorios y los miRNAs asociados con el daño cardíaco que participan en la fase aguda de la miocarditis, podrían seguir afectados e involucrados en la fase crónica, estimulando la progresión de la enfermedad (Cihakova and Rose, 2008). Recientemente se ha descrito que miR-21 está implicado en la progresión de la miocarditis viral hacia cardiomiopatía dilatada (Xu et al., 2014). Estos resultados indican que los cambios en la expresión de miR-21 podrían contribuir a la progresión de la miocarditis a una DCM. Además, también se han encontrado niveles elevados de miR-208b y miR-499 en pacientes en fases posteriores de la miocarditis viral y en pacientes con

DCM (Sato et al., 2010). Aparte de miR-21, miR-208b y miR-499, no se han identificado otros miRNAs específicos implicados en la fase crónica de la miocarditis, sin embargo, puede que los miRNAs involucrados en la inflamación y el daño durante la fase aguda, se expresen de persistentemente también durante la fase crónica de la miocarditis (van den Hoogen et al., 2015).

En general, los miRNAs implicados en las respuestas inflamatorias se encuentran desregulados y la mayor parte de los miRNAs específicos del músculo (myomiRs) se sobreexpresan durante la miocarditis humana (van den Hoogen et al., 2015). Dado que la fase crónica de la miocarditis puede progresar en insuficiencia cardíaca, también se ha planteado la hipótesis de que los miRNAs implicados en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca no isquémica puedan estar participando en la fase crónica de la enfermedad (van den Hoogen et al., 2015).

Los microRNAs están involucrados en la patogénesis y progresión de la insuficiencia cardíaca (Xing et al., 2014). Se sabe que el corazón responde al daño cardíaco activando de vías de señalización que conducen a la remodelación y la hipertrofia de los cardiomiocitos (van Rooij et al., 2008). Con el tiempo, la fibrosis miocárdica y la dilatación del ventrículo izquierdo pueden resultar en una insuficiencia cardíaca. Se han identificado múltiples miRNAs con patrones de expresión aberrantes en pacientes con insuficiencia cardíaca isquémica (Bronze-da-Rocha, 2014; De Rosa et al., 2014; Thum et al., 2007; van de Vrie et al., 2011). Por ejemplo, la expresión de miR-21, -22, -23, -146, -195, -199 y 499 se encuentra aumentada en pacientes con insuficiencia cardíaca, mientras que la expresión de miR-1, -29, -133 y -150 se encuentra disminuida (Huang and Wang, 2014; Kumarswamy and Thum, 2013).

Los miRNAs involucrados en las respuestas inflamatorias que llevan a la insuficiencia cardíaca no isquémica, siguen siendo objeto de investigación. Actualmente se han identificado algunos potenciales miRNAs en pacientes con insuficiencia cardíaca no isquémica, como miR-21, miR-146a/b, -155, -423-5p y el cluster miR-17-92 (Tijssen et al., 2010; van de Vrie et al., 2011; Vogel et al., 2013). Por otra parte, miR-200b, -519, -520d, -558 y -622 se han identificado como biomarcadores de la insuficiencia cardíaca no isquémica con fracción de eyección reducida (HF-REF), sin embargo, estos miRNAs todavía tienen que ser validados en otros estudios (Vogel et al., 2013). Algunos de los miRNAs identificados en pacientes con insuficiencia cardíaca también se expresan de forma aberrante en pacientes con miocarditis, señalando un posible papel de estos miRNAs en la progresión de la miocarditis hacia el fallo cardíaco. Sin embargo, hacen falta más investigaciones para verificar estos miRNAs y para identificar si existen otros miRNAs específicos de la miocarditis y si están involucrados específicamente en la progresión hacia la insuficiencia cardíaca (van den Hoogen et al., 2015).

Cuando se descubrió la presencia y gran estabilidad de los miRNAs en el plasma sanguíneo (Mitchell et al., 2008), se generó un gran interés en la posibilidad de que sus perfiles de expresión pudieran ser indicadores no invasivos de distintas enfermedades y desórdenes. Efectivamente, desde entonces se ha confirmado en cientos de trabajos que los miRNAs circulantes pueden ser empleados como biomarcadores fiables para identificar y monitorizar una gran variedad de patologías a través de una simple muestra de sangre (Kinet et al., 2013). Por ejemplo, en las enfermedades cardiovasculares ya conocemos perfiles de expresión de miRNAs en plasma distintivos del infarto de miocardio (Wang et al., 2010), la insuficiencia cardíaca (Tijssen et al., 2010), la aterosclerosis (Fichtlscherer et al., 2010), la diabetes mellitus tipo 2 (Zampetaki et al., 2010) o la hipertensión (Li et al., 2011a). Pero además de servir como biomarcadores, dado que la desregulación de los miRNAs es una característica común en el cáncer, los desórdenes del sistema nervioso central, la inflamación, las enfermedades cardiovasculares y los desórdenes metabólicos, los miRNAs también sirven como dianas terapéuticas en gran variedad de enfermedades (van Rooij and Kauppinen, 2014). Las principales estrategias que se están estudiando para modular la actividad de los miRNAs consisten en reestablecer su función mediante miRNAs sintéticos de doble cadena o vectores virales que lo sobreexpresen, o bien en inhibir su función con oligonucleótidos anti-miR (van Rooij and Kauppinen, 2014). Además, la corta longitud de sus secuencias les convierte en una diana terapéutica fácil y la alta conservación entre especies permite usar la misma molécula en los estudios preclínicos con animales que en los ensayos clínicos en humanos (van Rooij and Kauppinen, 2014).

Debido a su gran potencial clínico, hemos analizado los niveles de miR-721 en la sangre de ratones WT y CD69KO en el modelo de la EAM. El resultado obtenido fue un espectacular aumento de la expresión de miR-721 en el suero de los ratones con miocarditis respecto a los animales control. Además, tanto en los ratones enfermos como en los control, los ratones CD69KO presentaron niveles significativamente mayores de miR-721 que los WT. Estas observaciones sugieren que miR-721 juega un papel en la miocarditis experimental autoinmune y que la sobreexpresión de miR-721 en el suero sanguíneo está relacionada con una mayor severidad de la enfermedad, lo que hace de este miRNA una molécula muy atractiva como biomarcador de la enfermedad.

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miR-155 o de SOCS1 en el corazón de los ratones con EAM, se observó un incremento en la expresión de miR-155 en el suero de la sangre entre los ratones control WT y CD69KO, y entre los ratones WT control y los WT enfermos. Estos resultados parecen indicar que miR-155 tiene

un papel en la EAM que no parece estar mediado por CD69 y son coherentes con todos los demás datos publicados sobre miR-155 que hemos comentado anteriormente, acerca de su sobreexpresión en el tejido cardíaco de pacientes con miocarditis aguda y su función durante la fase inflamatoria aguda de la miocarditis tanto en humano como en ratón (Corsten et al., 2012).

5. Análisis de linfocitos T_H17, células T reguladoras y expresión de miRNAs en la sangre de pacientes con cardiomiopatías

La inflamación del miocardio o miocarditis es una enfermedad de etiología heterogénea ocasionada generalmente por un patógeno infeccioso (bacterias, virus, hongos o protozoos) (Andreoletti et al., 2009) o por un trastorno autoinmune (Frustaci et al., 2009), que puede derivar en una cardiomiopatía dilatada (Felker et al., 2000). Las células T CD4⁺ son necesarias y suficientes para el desarrollo de la miocarditis (Smith and Allen, 1991; Smith and Allen, 1993). En concreto, los linfocitos T_H17 (Sonderegger et al., 2006) y la IL-23 son críticos para el desarrollo de la patología, siendo las células T_H17 más inmunopatogénicas que las T_H1, cuando son transferidas exógenamente (Rangachari et al., 2006). Además la supresión de la diferenciación de las células T_H17 mediante el bloqueo de la vía de señalización de IL-6 previene el desarrollo de la EAM (Sonderegger et al., 2008; Yamashita et al., 2011). En cuanto a la IL-17, se ha visto que esta citoquina no participa en el desarrollo inicial de la miocarditis pero juega un papel crucial en la fibrosis y el remodelado que sufre el corazón en etapas más avanzadas de la enfermedad (Baldeviano et al., 2010). En humanos, estamos próximos a constatar la relevancia clínica de las células T_H17 y de hecho, en pacientes con miocarditis viral ya se ha detectado expresión de IL-17A y RORγt en el corazón y se ha visto que las células T_H17 ayudan a las células B a producir anticuerpos frente a proteínas cardíacas (Yuan et al., 2010). Sin embargo, poco se ha investigado acerca de las células T_H17 circulantes en la sangre de los pacientes con miocarditis. Sólo conocemos un estudio en el que se comparó la proporción de linfocitos T_H17 en la sangre de pacientes con cardiomiopatía dilatada frente a la de sujetos sanos, encontrándose un mayor porcentaje de células T_H17 y una mayor cantidad de IL-17, IL-6, IL-23 y RORγt en la sangre de los sujetos enfermos respecto a la sangre de los individuos sanos (Yi et al., 2009).

Otra población de células T CD4⁺ cruciales en el desarrollo de la miocarditis son las células T reguladoras. Se ha detectado expresión de FoxP3 en las biopsias de endocardio de pacientes con cardiomiopatía dilatada (Noutsias et al., 2011). Además, la depleción de las células Treg permite el desarrollo espontáneo de miocarditis (Ono et al., 2006), mientras que la transferencia exógena de Treg limita la inflamación cardíaca y atenúa la replicación viral en respuesta a la

infección con CVB3 o *Tripanosoma cruzi* (Mariano et al., 2008; Shi et al., 2010). Las células Treg también son responsables de la inducción de la tolerancia por vía nasal frente a auto-antígenos, lo que evita que la infección por CVB3 progrese en una miocarditis crónica (Foustieri et al., 2011). De manera similar, la citoquina IL-10 limita la inflamación autoinmune del corazón mediante la tolerancia inducida por vía nasal (Kaya et al., 2002). Sin embargo, existe una discrepancia sustancial acerca del valor predictivo de la proporción de linfocitos Treg circulantes en sangre en los pacientes con patologías cardíacas agudas y crónicas (Ammirati et al., 2010; Carvalheiro et al., 2012; Sardella et al., 2007). Por este motivo hemos estudiado la proporción de células T CD4⁺ totales, T_H17 y Treg circulantes en la sangre de pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica y cardiomiopatía de takotsubo en comparación con voluntarios sanos, y para explorar su potencial como dianas terapéuticas.

Encontramos niveles muy elevados de células T CD4⁺ totales y T_H17 en la sangre de pacientes con miocarditis aguda, dato coherente con el hecho de que las células CD4⁺ sean necesarias y suficientes para el desarrollo de la miocarditis (Smith and Allen, 1991; Smith and Allen, 1993) y que los linfocitos T_H17 son críticos para el desarrollo de la patología (Sonderegger et al., 2006). También observamos la práctica desaparición de células Treg en la sangre de estos pacientes, lo que contribuiría a la disminución de respuesta antiinflamatoria en la patología. Además, parece que esta drástica disminución en los niveles de Treg circulantes se debe a la reducción del porcentaje de las células CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ CD45RA⁻ CD45RO⁺ (Tregs de memoria), ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la población de células CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ (Tregs naïve) entre estos pacientes y los sujetos control en la fase crónica de la enfermedad.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de células CD4⁺ totales ni T_H17 circulantes respecto a los sujetos sanos en los pacientes con miocarditis crónica. Sin embargo, los pacientes siguen teniendo una proporción de células Treg totales y de memoria significativamente inferior a la de los individuos sanos. Estas observaciones apuntan hacia un posible papel de las células Treg en la patogénesis de la enfermedad también durante la fase crónica y señalan que la miocarditis provoca una desviación en el número de linfocitos T CD4⁺ circulantes en sangre que puede servir como indicador de las distintas etapas de la enfermedad.

En cuanto a la cardiomiopatía de takotsubo, la única diferencia estadísticamente significativa hallada fue una mayor proporción de células CD4⁺ totales en la sangre de estos pacientes en comparación con los sujetos control. El síndrome de takotsubo es una cardiomiopatía inducida por estrés que puede ser confundida con otros síndromes coronarios agudos más serios debido a que sus características clínicas son similares a las de un infarto de miocardio (Kohan et al.,

2014). Su nombre se debe a la similitud existente entre la forma que adopta el ventrículo izquierdo del corazón en esta cardiomiopatía y las trampas de pulpos tradicionales en Japón (tako tsubo), donde fue descrita por primera vez en 1991 (Dote et al., 1991). Esta cardiomiopatía afecta sobre todo a mujeres postmenopáusicas después de sufrir un estrés físico o emocional, pero todavía no están claras las causas que la originan, siendo las teorías más estudiadas: trombolisis espontánea de un trombo coronario, vasoespasmo coronario múltiple, disfunción microcirculatoria y aturdimiento miocárdico mediado por catecolaminas (Kohan et al., 2014). Aunque aún no existen muchas evidencias en la literatura, la inflamación está presente en este síndrome y juega un papel en él (Akashi et al., 2008; Eitel et al., 2010; Jimenez-Lopez et al., 2012). La biopsia del miocardio de la mayoría de los pacientes con síndrome de takotsubo presenta infiltrados intersticiales de linfocitos, otros leucocitos y macrófagos; fibrosis miocárdica; y contracción de las bandas con o sin necrosis miocítica. Los cambios inflamatorios y la contracción de las bandas distinguen la cardiomiopatía de takotsubo de la necrosis coagulativa que tiene lugar en el infarto de miocardio como consecuencia de la oclusión arterial coronaria (Akashi et al., 2008). Nuestra observación de que los pacientes con takotsubo presentan un porcentaje de células T CD4⁺ circulantes en sangre mayor que los sujetos sanos corrobora la importancia de la inflamación en la patofisiología de esta enfermedad, sin que las células T_H17 o Treg parezcan jugar un papel importante.

Por último, ya que los ratones con miocarditis presentan niveles de expresión de miR-721 y miR-155 en el suero sanguíneo muy superiores a los de los ratones control, analizamos la expresión de estos miRNAs en el plasma de pacientes con las diferentes cardiomiopatías. El resultado fue un extraordinario aumento de la expresión de miR-721 y miR-155 en el plasma de pacientes con miocarditis aguda en comparación con sujetos sanos. Los pacientes en la fase crónica de la enfermedad también presentaron niveles de expresión de estos miRNAs muy superiores a los de los voluntarios sanos, pero no tan altos como durante la fase aguda. Y en cuanto a la cardiomiopatía de takotsubo, llama la atención el espectacular aumento de la expresión de miR-721 y miR-155 en la sangre de los pacientes con este síndrome en comparación con los sujetos control. Estos resultados apuntan al posible papel de estos miRNAs en la patofisiología de la miocarditis y la cardiomiopatía dilatada, siendo susceptibles de ser estudiados como biomarcadores y/o dianas terapéuticas de estas enfermedades. De hecho, durante la realización de esta tesis doctoral se publicó un trabajo que demuestra que miR-155 es sobreexpresado durante la miocarditis viral aguda tanto en ratón como en humanos, contribuyendo a la inflamación adversa que tiene lugar en el corazón en respuesta a la infección viral y postulándose como una potencial diana terapéutica para la miocarditis viral (Corsten et al., 2012). Asimismo este mismo grupo había descrito anteriormente la asociación entre el daño miocárdico provocado por diversas enfermedades cardiovasculares y la alteración en los niveles

de expresión de miRNA-208b y miRNA-499 en el plasma sanguíneo de los pacientes (Corsten et al., 2010).

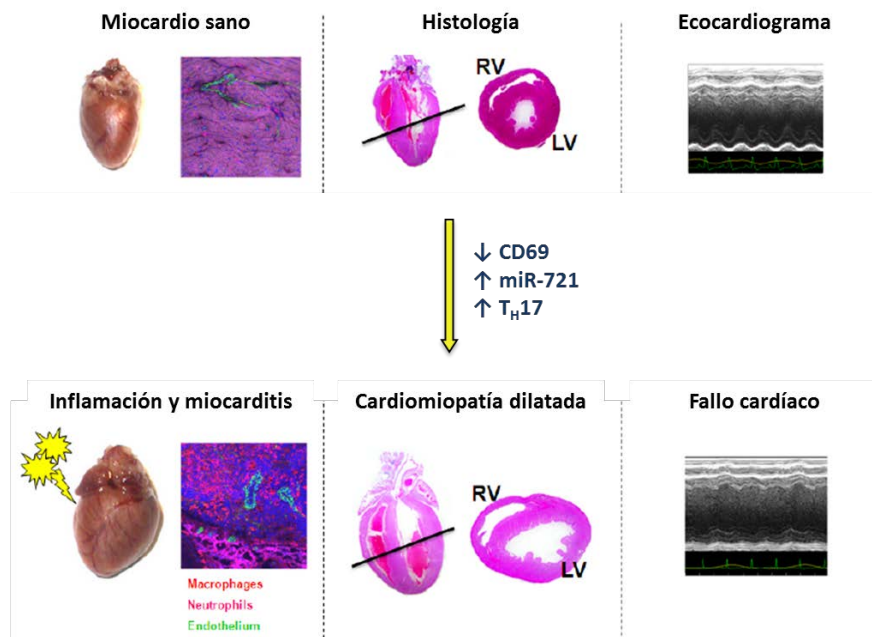


Figura 33. Esquema que representa el papel de CD69 en el control de la respuesta pro-inflamatoria T_H17 mediante la regulación de miR-721 en el modelo murino de EAM y en pacientes con cardiomiopatías. En esta ilustración se hace referencia al papel de CD69 descrito en la bibliografía y observado en nuestros resultados experimentales. La inducción de la EAM se correlaciona con el aumento en la expresión de miR-721 tanto en el miocardio como en el suero de los ratones. Además, los ratones CD69KO, que presentan una mayor severidad de la enfermedad, muestran niveles de expresión de miR-721 significativamente superiores a los de los ratones WT. En los pacientes con cardiomiopatías, los niveles de expresión de miR-721 en plasma están muy aumentados respecto a los niveles normales de los individuos sanos, siendo mayores en los pacientes con miocarditis aguda que en los que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad. Estos datos sugieren que CD69 podría controlar la respuesta pro-inflamatoria T_H17 en la miocarditis mediante la regulación de miR-721.

CONCLUSIONES

- La expresión de CD69 es crítica tanto para la generación de las células nTreg en el timo como para la función supresora de las mismas, a través de la inducción de la secreción de IL-10.
- CD69 regula diferencialmente la expresión de miR-721 en las células CD4⁺ naive, T_H17 y Tregs. En animales deficientes en CD69 la expresión de miR-721 está inducida en CD4⁺ naive y T_H17 e inhibida en Tregs.
- La disminución de la expresión de AHR en las T_H17 de animales CD69KO, a nivel de proteína pero no de mRNA, sugiere que miR-721 podría estar regulando la expresión de su potencial diana AHR en estas células mediante la inhibición de su traducción.
- MiR-155 también tiene un papel en la respuesta inflamatoria de la miocarditis, pero ese rol no parece estar mediado por CD69. Los linfocitos T CD4⁺ naive, T_H17 y Treg no muestran diferencias consistentes en sus niveles de expresión de miR-155 ni SOCS1 entre células WT y CD69KO.
- La inducción de EAM se correlaciona con el aumento en la expresión de miR-721 y miR-155 en el suero de ratones. Los ratones CD69KO, que presentan una mayor severidad de la enfermedad, presentan niveles de expresión de miR-721 en suero significativamente superiores a los de los ratones CD69WT, mientras que los niveles de miR-155 o de su diana SOCS-1 no están alterados entre los dos grupos. Estos datos sugieren que CD69 podría controlar la respuesta pro-inflamatoria T_H17 en EAM mediante la regulación de miR-721.
- En el modelo animal de EAM, la expresión de miR-721 también aumenta en el miocardio de los ratones durante la fase aguda, probablemente debido a la infiltración de células T_H17. Aunque los niveles de AHR no varían significativamente en este tejido, se observa una tendencia a la baja de su expresión en corazón de ratones CD69KO con miocarditis, que correlaciona con la posible regulación de AHR por miR-721.
- En los pacientes con miocarditis y cardiomiopatías dilatadas los porcentajes de linfocitos T CD4⁺, T_H17 y Treg en sangre están alterados. Los pacientes con miocarditis aguda presentan un alto porcentaje de células T CD4⁺ totales y T_H17 en sangre, mientras que prácticamente carecen de Treg totales y de memoria. En pacientes de cardiopatía dilatada los niveles de células T CD4⁺ y T_H17 son normales, aunque tienen menos Treg totales y de memoria que los individuos sanos.
- En la cardiomiopatía de takotsubo o miocarditis por estrés, únicamente encontramos una mayor proporción de células T CD4⁺, por lo que parece que se trata de una patología T_H17-independiente.
- Los niveles de expresión de miR-155 y miR-721 en el plasma de los pacientes están muy aumentados respecto a los niveles normales de los individuos sanos, siendo especialmente

elevados en los pacientes con takotsubo, y mayores en los pacientes con miocarditis aguda que en los que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., C. Benoist, J.A. Bluestone, D.J. Campbell, S. Ghosh, S. Hori, S. Jiang, V.K. Kuchroo, D. Mathis, M.G. Roncarolo, A. Rudensky, S. Sakaguchi, E.M. Shevach, D.A. Vignali, and S.F. Ziegler. 2013. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 14:307-308.
- Akashi, Y.J., D.S. Goldstein, G. Barbaro, and T. Ueyama. 2008. Takotsubo cardiomyopathy: a new form of acute, reversible heart failure. *Circulation* 118:2754-2762.
- Ammirati, E., D. Cianflone, M. Banfi, V. Vecchio, A. Palini, M. De Metrio, G. Marenzi, C. Panciroli, G. Tumminello, A. Anzuini, A. Palloschi, L. Grigore, K. Garlaschelli, S. Tramontana, D. Tavano, F. Airolidi, A.A. Manfredi, A.L. Catapano, and G.D. Norata. 2010. Circulating CD4+CD25hiCD127lo regulatory T-Cell levels do not reflect the extent or severity of carotid and coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1832-1841.
- Andreoletti, L., N. Leveque, C. Boulagnon, C. Brasselet, and P. Fornes. 2009. Viral causes of human myocarditis. *Arch Cardiovasc Dis* 102:559-568.
- Aretz, H.T., M.E. Billingham, W.D. Edwards, S.M. Factor, J.T. Fallon, J.J. Fenoglio, Jr., E.G. Olsen, and F.J. Schoen. 1987. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1:3-14.
- Arroyo, J.D., J.R. Chevillet, E.M. Kroh, I.K. Ruf, C.C. Pritchard, D.F. Gibson, P.S. Mitchell, C.F. Bennett, E.L. Pogosova-Agadjanyan, D.L. Stirewalt, J.F. Tait, and M. Tewari. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5003-5008.
- Aujla, S.J., Y.R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D.J. Askew, D.A. Pociask, T.A. Reinhart, F. McAllister, J. Edeal, K. Gaus, S. Husain, J.L. Kreindler, P.J. Dubin, J.M. Pilewski, M.M. Myerburg, C.A. Mason, Y. Iwakura, and J.K. Kolls. 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14:275-281.
- Baldeviano, G.C., J.G. Barin, M.V. Talor, S. Srinivasan, D. Bedja, D. Zheng, K. Gabrielson, Y. Iwakura, N.R. Rose, and D. Cihakova. 2010. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 106:1646-1655.
- Bankovich, A.J., L.R. Shiow, and J.G. Cyster. 2010. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J Biol Chem* 285:22328-22337.
- Barczyk, A., W. Pierzchala, and E. Sozanska. 2003. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* 97:726-733.
- Barin, J.G., and D. Cihakova. 2013. Control of inflammatory heart disease by CD4+ T cells. *Ann N Y Acad Sci* 1285:80-96.
- Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-233.
- Barthlott, T., H. Kohler, H. Pircher, and K. Eichmann. 1997. Differentiation of CD4(high)CD8(low) coreceptor-skewed thymocytes into mature CD8 single-positive cells independent of MHC class I recognition. *Eur J Immunol* 27:2024-2032.
- Basso, C., F. Calabrese, A. Angelini, E. Carturan, and G. Thiene. 2012. Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart Fail Rev*
- Benson, J.M., and D.M. Shepherd. 2011. Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease. *Toxicol Sci* 120:68-78.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
- Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453:1051-1057.

- Bieber, T., A. Rieger, G. Stingl, E. Sander, P. Wanek, and I. Strobel. 1992. CD69, an early activation antigen on lymphocytes, is constitutively expressed by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 98:771-776.
- Booth, N.J., A.J. McQuaid, T. Sobande, S. Kissane, E. Agius, S.E. Jackson, M. Salmon, F. Falciani, K. Yong, M.H. Rustin, A.N. Akbar, and M. Vukmanovic-Stejic. 2010. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4⁺ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol* 184:4317-4326.
- Boronat, S., S. Casado, J.M. Navas, and B. Pina. 2007. Modulation of aryl hydrocarbon receptor transactivation by carbaryl, a nonconventional ligand. *FEBS J* 274:3327-3339.
- Brandes, M.E., J.B. Allen, Y. Ogawa, and S.M. Wahl. 1991. Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J Clin Invest* 87:1108-1113.
- Bronze-da-Rocha, E. 2014. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases. *BioMed research international* 2014:985408.
- Brustle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T.W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 8:958-966.
- Burchill, M.A., J. Yang, K.B. Vang, J.J. Moon, H.H. Chu, C.W. Lio, A.L. Vegoe, C.S. Hsieh, M.K. Jenkins, and M.A. Farrar. 2008. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28:112-121.
- Carvalho, T., I. Velada, A. Valado, F. Mendes, A. Martinho, N. Antonio, L. Goncalves, L. Providencia, M.L. Pais, and A. Paiva. 2012. Phenotypic and functional alterations on inflammatory peripheral blood cells after acute myocardial infarction. *Journal of cardiovascular translational research* 5:309-320.
- Caspar-Bauguil, S., M. Saadawi, A. Negre-Salvayre, M. Thomsen, R. Salvayre, and H. Benoist. 1998. Mildly oxidized low-density lipoproteins suppress the proliferation of activated CD4⁺ T-lymphocytes and their interleukin 2 receptor expression in vitro. *Biochem J* 330 (Pt 2):659-666.
- Cihakova, D., and N.R. Rose. 2008. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Advances in immunology* 99:95-114.
- Cihakova, D., R.B. Sharma, D. Fairweather, M. Afanasyeva, and N.R. Rose. 2004. Animal models for autoimmune myocarditis and autoimmune thyroiditis. *Methods Mol Med* 102:175-193.
- Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R.S. Blumberg, and D.A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
- Corsten, M.F., R. Dennert, S. Jochems, T. Kuznetsova, Y. Devaux, L. Hofstra, D.R. Wagner, J.A. Staessen, S. Heymans, and B. Schroen. 2010. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circulation. Cardiovascular genetics* 3:499-506.
- Corsten, M.F., A. Papageorgiou, W. Verhesen, P. Carai, M. Lindow, S. Obad, G. Summer, S.L. Coort, M. Hazebroek, R. van Leeuwen, M.J. Gijbels, E. Wijnands, E.A. Biessen, M.P. De Winther, F.R. Stassen, P. Carmeliet, S. Kauppinen, B. Schroen, and S. Heymans. 2012. MicroRNA profiling identifies microRNA-155 as an adverse mediator of cardiac injury and dysfunction during acute viral myocarditis. *Circ Res* 111:415-425.
- Cortes, J.R., R. Sanchez-Diaz, E.R. Bovolenta, O. Barreiro, S. Lasarte, A. Matesanz-Marin, M.L. Toribio, F. Sanchez-Madrid, and P. Martin. 2014. Maintenance of immune tolerance by Foxp3⁺ regulatory T cells requires CD69 expression. *Journal of autoimmunity* 55:51-62.
- Coventry, B.J., S.C. Weeks, S.E. Heckford, P.J. Sykes, J. Bradley, and J.M. Skinner. 1996. Lack of IL-2 cytokine expression despite IL-2 messenger RNA transcription in tumor-infiltrating lymphocytes in primary human breast carcinoma: selective expression of early activation markers. *J Immunol* 156:3486-3492.

- Cruz-Adalia, A., L.J. Jimenez-Borreguero, M. Ramirez-Huesca, I. Chico-Calero, O. Barreiro, E. Lopez-Conesa, M. Fresno, F. Sanchez-Madrid, and P. Martin. 2010. CD69 limits the severity of cardiomyopathy after autoimmune myocarditis. *Circulation* 122:1396-1404.
- Curotto de Lafaille, M.A., and J.J. Lafaille. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30:626-635.
- Czeloth, N., G. Bernhardt, F. Hofmann, H. Genth, and R. Forster. 2005. Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells. *J Immunol* 175:2960-2967.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
- Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang, and C.Y. Zhang. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research* 18:997-1006.
- Das, L.M., M.D. Torres-Castillo, T. Gill, and A.D. Levine. 2013. TGF-beta conditions intestinal T cells to express increased levels of miR-155, associated with down-regulation of IL-2 and itk mRNA. *Mucosal Immunol* 6:167-176.
- Davidson, T.S., R.J. DiPaolo, J. Andersson, and E.M. Shevach. 2007. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 178:4022-4026.
- de Araujo, F.F., D.M. Vitelli-Avelar, A. Teixeira-Carvalho, P.R. Antas, J. Assis Silva Gomes, R. Sathler-Avelar, M. Otavio Costa Rocha, S.M. Eloi-Santos, R.T. Pinho, R. Correa-Oliveira, and O.A. Martins-Filho. 2011. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS neglected tropical diseases* 5:e992.
- de la Fuente, H., A. Cruz-Adalia, G. Martinez Del Hoyo, D. Cibrian-Vera, P. Bonay, D. Perez-Hernandez, J. Vazquez, P. Navarro, R. Gutierrez-Gallego, M. Ramirez-Huesca, P. Martin, and F. Sanchez-Madrid. 2014. The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. *Mol Cell Biol* 34:2479-2487.
- De Maria, R., M.G. Cifone, R. Trotta, M.R. Rippo, C. Festuccia, A. Santoni, and R. Testi. 1994. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J Exp Med* 180:1999-2004.
- De Rosa, S., A. Curcio, and C. Indolfi. 2014. Emerging role of microRNAs in cardiovascular diseases. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 78:567-575.
- Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265.
- Di Meglio, P., J.H. Duarte, H. Ahlfors, N.D. Owens, Y. Li, F. Villanova, I. Tosi, K. Hirota, F.O. Nestle, U. Mrowietz, M.J. Gilchrist, and B. Stockinger. 2014. Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity* 40:989-1001.
- Divekar, A.A., S. Dubey, P.R. Gangalum, and R.R. Singh. 2011. Dicer insufficiency and microRNA-155 overexpression in lupus regulatory T cells: an apparent paradox in the setting of an inflammatory milieu. *J Immunol* 186:924-930.
- Dote, K., H. Sato, H. Tateishi, T. Uchida, and M. Ishihara. 1991. [Myocardial stunning due to simultaneous multivessel coronary spasms: a review of 5 cases]. *Journal of cardiology* 21:203-214.
- Duerr, R.H., K.D. Taylor, S.R. Brant, J.D. Rioux, M.S. Silverberg, M.J. Daly, A.H. Steinhart, C. Abraham, M. Regueiro, A. Griffiths, T. Dassopoulos, A. Bitton, H. Yang, S. Targan, L.W. Datta, E.O. Kistner, L.P. Schumm, A.T. Lee, P.K. Gregersen, M.M. Barmada, J.I. Rotter,

- D.L. Nicolae, and J.H. Cho. 2006. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314:1461-1463.
- Durant, L., W.T. Watford, H.L. Ramos, A. Laurence, G. Vahedi, L. Wei, H. Takahashi, H.W. Sun, Y. Kanno, F. Powrie, and J.J. O'Shea. 2010. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* 32:605-615.
- Eitel, I., C. Lucke, M. Grothoff, M. Sareban, G. Schuler, H. Thiele, and M. Gutberlet. 2010. Inflammation in takotsubo cardiomyopathy: insights from cardiovascular magnetic resonance imaging. *European radiology* 20:422-431.
- Elliott, P., B. Andersson, E. Arbustini, Z. Bilinska, F. Cecchi, P. Charron, O. Dubourg, U. Kuhl, B. Maisch, W.J. McKenna, L. Monserrat, S. Pankuweit, C. Rapezzi, P. Seferovic, L. Tavazzi, and A. Keren. 2008. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 29:270-276.
- Escobar, T., C.R. Yu, S.A. Muljo, and C.E. Egwuagu. 2013. STAT3 activates miR-155 in Th17 cells and acts in concert to promote experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:4017-4025.
- Escribano, L., A. Orfao, J. Villarrubia, F. Martin, J.I. Madruga, M. Cuevas, J.L. Velasco, A. Rios, and J.F. San Miguel. 1997. Sequential immunophenotypic analysis of mast cells in a case of systemic mast cell disease evolving to a mast cell leukemia. *Cytometry* 30:98-102.
- Felker, G.M., R.E. Thompson, J.M. Hare, R.H. Hruban, D.E. Clemetson, D.L. Howard, K.L. Baughman, and E.K. Kasper. 2000. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* 342:1077-1084.
- Fichtlscherer, S., S. De Rosa, H. Fox, T. Schwietz, A. Fischer, C. Liebetrau, M. Weber, C.W. Hamm, T. Roxel, M. Muller-Ardogan, A. Bonauer, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2010. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 107:677-684.
- Flajnik, M.F., and L. Du Pasquier. 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol* 25:640-644.
- Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
- Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6:1142-1151.
- Fousteri, G., A. Dave, B. Morin, S. Omid, M. Croft, and M.G. von Herrath. 2011. Nasal cardiac myosin peptide treatment and OX40 blockade protect mice from acute and chronic virally-induced myocarditis. *Journal of autoimmunity* 36:210-220.
- Frustaci, A., C. Chimenti, F. Calabrese, M. Pieroni, G. Thiene, and A. Maseri. 2003. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 107:857-863.
- Frustaci, A., M.A. Russo, and C. Chimenti. 2009. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur Heart J* 30:1995-2002.
- Gandhi, R., M.F. Farez, Y. Wang, D. Kozoriz, F.J. Quintana, and H.L. Weiner. 2010. Cutting edge: human latency-associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset. *J Immunol* 184:4620-4624.
- Garcia-Monzon, C., R. Moreno-Otero, J.M. Pajares, A. Garcia-Sanchez, M. Lopez-Botet, M.O. de Landazuri, and F. Sanchez-Madrid. 1990. Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8+ T lymphocytes in viral chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 98:1029-1035.
- Garin, M.I., C.C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait, and R.I. Lechler. 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109:2058-2065.

- Gavioli, R., A. Risso, D. Smilovich, I. Baldissarro, M.C. Capra, A. Bargellesi, and M.E. Cosulich. 1992. CD69 molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-transducing mechanisms. *Cell Immunol* 142:186-196.
- Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, and R.J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783-1786.
- Griffiths-Jones, S. 2004. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32:D109-111.
- Grossman, W.J., J.W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J.P. Atkinson, and T.J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21:589-601.
- Han, Y., Q. Guo, M. Zhang, Z. Chen, and X. Cao. 2009. CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 182:111-120.
- Hankinson, O. 2005. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys* 433:379-386.
- Harrill, J.A., R.R. Hukkanen, M. Lawson, G. Martin, B. Gilger, V. Soldatow, E.L. Lecluyse, R.A. Budinsky, J.C. Rowlands, and R.S. Thomas. 2013. Knockout of the aryl hydrocarbon receptor results in distinct hepatic and renal phenotypes in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 272:503-518.
- Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
- Harris, T.J., J.F. Grosso, H.R. Yen, H. Xin, M. Kortylewski, E. Albesiano, E.L. Hipkiss, D. Getnet, M.V. Goldberg, C.H. Maris, F. Housseau, H. Yu, D.M. Pardoll, and C.G. Drake. 2007. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 179:4313-4317.
- Hartnell, A., D.S. Robinson, A.B. Kay, and A.J. Wardlaw. 1993. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 80:281-286.
- Hashimoto, M., K. Hiwatashi, K. Ichiyama, R. Morita, T. Sekiya, A. Kimura, Y. Sugiyama, T. Sibata, K. Kuroda, R. Takahashi, and A. Yoshimura. 2011. SOCS1 regulates type I/type II NKT cell balance by regulating IFN-gamma signaling. *Int Immunol* 23:165-176.
- He, D., L. Wu, H.K. Kim, H. Li, C.A. Elmet, and H. Xu. 2006. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 177:6852-6858.
- He, J., Y. Yue, C. Dong, and S. Xiong. 2013. MiR-21 confers resistance against CVB3-induced myocarditis by inhibiting PDCD4-mediated apoptosis. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale* 36:E103-111.
- Herskowitz, A., S. Campbell, J. Deckers, E.K. Kasper, J. Boehmer, D. Hadian, D.A. Neumann, and K.L. Baughman. 1993. Demographic features and prevalence of idiopathic myocarditis in patients undergoing endomyocardial biopsy. *Am J Cardiol* 71:982-986.
- Heymans, S., M.F. Corsten, W. Verhesen, P. Carai, R.E. van Leeuwen, K. Custers, T. Peters, M. Hazebroek, L. Stoger, E. Wijnands, B.J. Janssen, E.E. Creemers, Y.M. Pinto, D. Grimm, N. Schurmann, E. Vigorito, T. Thum, F. Stassen, X. Yin, M. Mayr, L.J. de Windt, E. Lutgens, K. Wouters, M.P. de Winther, S. Zacchigna, M. Giacca, M. van Bilsen, A.P. Papageorgiou, and B. Schroen. 2013. Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure. *Circulation* 128:1420-1432.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
- Horino, J., M. Fujimoto, F. Terabe, S. Serada, T. Takahashi, Y. Soma, K. Tanaka, T. Chinen, A. Yoshimura, S. Nomura, I. Kawase, N. Hayashi, T. Kishimoto, and T. Naka. 2008.

- Suppressor of cytokine signaling-1 ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Int Immunol* 20:753-762.
- Hsieh, C.S., Y. Zheng, Y. Liang, J.D. Fontenot, and A.Y. Rudensky. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7:401-410.
- Hu, R., T.B. Huffaker, D.A. Kagele, M.C. Runtsch, E. Bake, A.A. Chaudhuri, J.L. Round, and R.M. O'Connell. 2013. MicroRNA-155 confers encephalogenic potential to Th17 cells by promoting effector gene expression. *J Immunol* 190:5972-5980.
- Huang, Z.P., and D.Z. Wang. 2014. miR-22 in cardiac remodeling and disease. *Trends in cardiovascular medicine* 24:267-272.
- Ishikawa, S., S. Akakura, M. Abe, K. Terashima, K. Chijiwa, H. Nishimura, S. Hirose, and T. Shirai. 1998. A subset of CD4⁺ T cells expressing early activation antigen CD69 in murine lupus: possible abnormal regulatory role for cytokine imbalance. *J Immunol* 161:1267-1273.
- Ivanov, I.I., B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelletier, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
- Jager, L.D., R. Dabelic, L.W. Waiboci, K. Lau, M.S. Haider, C.M. Ahmed, J. Larkin, 3rd, S. David, and H.M. Johnson. 2011. The kinase inhibitory region of SOCS-1 is sufficient to inhibit T-helper 17 and other immune functions in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 232:108-118.
- Jimenez-Lopez, J., M.A. Arias, J. Casares-Medrano, M. Pachon, J.L. Orradre, and A. Puchol. 2012. Tako-tsubo cardiomyopathy with apical variant complicated by cardiac tamponade and mid-ventricular variant presentation during a delayed recurrence. *Revista espanola de cardiologia* 65:962-963.
- Jordan, M.S., A. Boesteanu, A.J. Reed, A.L. Petrone, A.E. Hohenbeck, M.A. Lerman, A. Naji, and A.J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2:301-306.
- Kaya, Z., K.M. Dohmen, Y. Wang, J. Schlichting, M. Afanasyeva, F. Leuschner, and N.R. Rose. 2002. Cutting edge: a critical role for IL-10 in induction of nasal tolerance in experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol* 168:1552-1556.
- Kerkvliet, N.I., L.B. Stepan, W. Vorachek, S. Oda, D. Farrer, C.P. Wong, D. Pham, and D.V. Mourich. 2009. Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3⁺ T cells in pancreatic lymph nodes. *Immunotherapy* 1:539-547.
- Khattry, R., T. Cox, S.A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337-342.
- Kim, D.H., P. Saetrom, O. Snove, Jr., and J.J. Rossi. 2008. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16230-16235.
- Kimura, A., T. Naka, K. Nohara, Y. Fujii-Kuriyama, and T. Kishimoto. 2008. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9721-9726.
- Kinet, V., J. Halkein, E. Dirkx, and L.J. Windt. 2013. Cardiovascular extracellular microRNAs: emerging diagnostic markers and mechanisms of cell-to-cell RNA communication. *Frontiers in genetics* 4:214.
- Kirkham, B.W., M.N. Lassere, J.P. Edmonds, K.M. Juhasz, P.A. Bird, C.S. Lee, R. Shnier, and I.J. Portek. 2006. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 54:1122-1131.
- Kmieciak, M., M. Gowda, L. Graham, K. Godder, H.D. Bear, F.M. Marincola, and M.H. Manjili. 2009. Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit

- effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. *J Transl Med* 7:89.
- Kobayashi, I., R. Shiari, M. Yamada, N. Kawamura, M. Okano, A. Yara, A. Iguchi, N. Ishikawa, T. Ariga, Y. Sakiyama, H.D. Ochs, and K. Kobayashi. 2001. Novel mutations of FOXP3 in two Japanese patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked syndrome (IPEX). *J Med Genet* 38:874-876.
- Kohan, A.A., E. Levy Yeyati, L. De Stefano, L. Dragonetti, M. Pietrani, D. Perez de Arenaza, C. Belziti, and R.D. Garcia-Monaco. 2014. Usefulness of MRI in takotsubo cardiomyopathy: a review of the literature. *Cardiovascular diagnosis and therapy* 4:138-146.
- Kohlhaas, S., O.A. Garden, C. Scudamore, M. Turner, K. Okkenhaug, and E. Vigorito. 2009. Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. *J Immunol* 182:2578-2582.
- Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:566-573.
- Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T.B. Strom, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484-487.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M.C. Nussenzweig, and H. von Boehmer. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6:1219-1227.
- Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11:597-610.
- Krueger, G.G., R.G. Langley, C. Leonardi, N. Yeilding, C. Guzzo, Y. Wang, L.T. Dooley, and M. Lebwohl. 2007. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med* 356:580-592.
- Kubo, M., T. Hanada, and A. Yoshimura. 2003. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 4:1169-1176.
- Kukreja, R.C., C. Yin, and F.N. Salloum. 2011. MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection. *Mol Pharmacol* 80:558-564.
- Kumarswamy, R., and T. Thum. 2013. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res* 113:676-689.
- Laffon, A., R. Garcia-Vicuna, A. Humbria, A.A. Postigo, A.L. Corbi, M.O. de Landazuri, and F. Sanchez-Madrid. 1991. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 88:546-552.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-858.
- Lamana, A., P. Martin, H. de la Fuente, L. Martinez-Munoz, A. Cruz-Adalia, M. Ramirez-Huesca, C. Escribano, K. Gollmer, M. Mellado, J.V. Stein, J.L. Rodriguez-Fernandez, F. Sanchez-Madrid, and G.M. del Hoyo. 2011. CD69 modulates sphingosine-1-phosphate-induced migration of skin dendritic cells. *J Invest Dermatol* 131:1503-1512.
- Lathrop, S.K., S.M. Bloom, S.M. Rao, K. Nutsch, C.W. Lio, N. Santacruz, D.A. Peterson, T.S. Stappenbeck, and C.S. Hsieh. 2011. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478:250-254.
- Lau, N.C., L.P. Lim, E.G. Weinstein, and D.P. Bartel. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-862.
- Laurence, A., C.M. Tato, T.S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R.B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E.M. Shevach, and J. O'Shea J. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26:371-381.

- Lawrie, C.H., S. Gal, H.M. Dunlop, B. Pushkaran, A.P. Liggins, K. Pulford, A.H. Banham, F. Pezzella, J. Boulwood, J.S. Wainscoat, C.S. Hatton, and A.L. Harris. 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology* 141:672-675.
- Lee, R.C., and V. Ambros. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:862-864.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854.
- Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
- Li, M.O., Y.Y. Wan, S. Sanjabi, A.K. Robertson, and R.A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146.
- Li, S., J. Zhu, W. Zhang, Y. Chen, K. Zhang, L.M. Popescu, X. Ma, W.B. Lau, R. Rong, X. Yu, B. Wang, Y. Li, C. Xiao, M. Zhang, S. Wang, L. Yu, A.F. Chen, X. Yang, and J. Cai. 2011a. Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation* 124:175-184.
- Li, Y., S. Innocenti, D.R. Withers, N.A. Roberts, A.R. Gallagher, E.F. Grigorieva, C. Wilhelm, and M. Veldhoen. 2011b. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell* 147:629-640.
- Lim, L.P., M.E. Glasner, S. Yekta, C.B. Burge, and D.P. Bartel. 2003a. Vertebrate microRNA genes. *Science* 299:1540.
- Lim, L.P., N.C. Lau, E.G. Weinstein, A. Abdelhakim, S. Yekta, M.W. Rhoades, C.B. Burge, and D.P. Bartel. 2003b. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17:991-1008.
- Lin, C.R., T.W. Wei, H.Y. Tsai, Y.T. Wu, P.Y. Wu, and S.T. Chen. 2015. Glycosylation-dependent interaction between CD69 and S100A8/S100A9 complex is required for regulatory T-cell differentiation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*
- Lind, E.F., A.R. Elford, and P.S. Ohashi. 2013. Micro-RNA 155 is required for optimal CD8+ T cell responses to acute viral and intracellular bacterial challenges. *J Immunol* 190:1210-1216.
- Lio, C.W., and C.S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.
- Littman, D.R., and A.Y. Rudensky. 2010. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 140:845-858.
- Liu, G., S. Burns, G. Huang, K. Boyd, R.L. Proia, R.A. Flavell, and H. Chi. 2009. The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR. *Nat Immunol* 10:769-777.
- Liu, H., and C. Rohowsky-Kochan. 2011. Interleukin-27-mediated suppression of human Th17 cells is associated with activation of STAT1 and suppressor of cytokine signaling protein 1. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 31:459-469.
- Liu, W., A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, and J.A. Bluestone. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701-1711.
- Liu, Y.L., W. Wu, Y. Xue, M. Gao, Y. Yan, Q. Kong, Y. Pang, and F. Yang. 2013. MicroRNA-21 and -146b are involved in the pathogenesis of murine viral myocarditis by regulating TH-17 differentiation. *Archives of virology* 158:1953-1963.
- Lopez-Cabrera, M., A.G. Santis, E. Fernandez-Ruiz, R. Blacher, F. Esch, P. Sanchez-Mateos, and F. Sanchez-Madrid. 1993. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the

- C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med* 178:537-547.
- Lu, L.F., M.P. Boldin, A. Chaudhry, L.L. Lin, K.D. Taganov, T. Hanada, A. Yoshimura, D. Baltimore, and A.Y. Rudensky. 2010. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142:914-929.
- Lu, L.F., T.H. Thai, D.P. Calado, A. Chaudhry, M. Kubo, K. Tanaka, G.B. Loeb, H. Lee, A. Yoshimura, K. Rajewsky, and A.Y. Rudensky. 2009. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 30:80-91.
- Lu, S.Y., X.J. Huang, K.Y. Liu, D.H. Liu, and L.P. Xu. 2012. High frequency of CD4⁺ CD25⁻ CD69⁺ T cells is correlated with a low risk of acute graft-versus-host disease in allotransplants. *Clin Transplant* 26:E158-167.
- Mack, D.G., A.M. Lanham, B.E. Palmer, L.A. Maier, and A.P. Fontenot. 2009. CD27 expression on CD4⁺ T cells differentiates effector from regulatory T cell subsets in the lung. *J Immunol* 182:7317-7324.
- Magnani, J.W., H.J. Danik, G.W. Dec, Jr., and T.G. DiSalvo. 2006. Survival in biopsy-proven myocarditis: a long-term retrospective analysis of the histopathologic, clinical, and hemodynamic predictors. *Am Heart J* 151:463-470.
- Mampaso, F., F. Sanchez-Madrid, R. Marcen, A. Molina, J. Pascual, T. Bricio, A. Martin, and V. Alvarez. 1993. Expression of adhesion molecules in allograft renal dysfunction. A distinct diagnostic pattern in rejection and cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 56:687-691.
- Mangan, P.R., L.E. Harrington, D.B. O'Quinn, W.S. Helms, D.C. Bullard, C.O. Elson, R.D. Hatton, S.M. Wahl, T.R. Schoeb, and C.T. Weaver. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234.
- Mariano, F.S., F.R. Gutierrez, W.R. Pavanelli, C.M. Milanezi, K.A. Cavassani, A.P. Moreira, B.R. Ferreira, F.Q. Cunha, C.R. Cardoso, and J.S. Silva. 2008. The involvement of CD4⁺CD25⁺ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 10:825-833.
- Maron, B.J., J.A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A.J. Moss, C.E. Seidman, and J.B. Young. 2006. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113:1807-1816.
- Martin-Gayo, E., E. Sierra-Filardi, A.L. Corbi, and M.L. Toribio. 2010. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 115:5366-5375.
- Martin, P., M. Gomez, A. Lamana, A. Cruz-Adalia, M. Ramirez-Huesca, M.A. Ursa, M. Yanez-Mo, and F. Sanchez-Madrid. 2010a. CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. *Mol Cell Biol* 30:4877-4889.
- Martin, P., M. Gomez, A. Lamana, A. Matesanz Marin, J.R. Cortes, M. Ramirez-Huesca, O. Barreiro, P. Lopez-Romero, C. Gutierrez-Vazquez, H. de la Fuente, A. Cruz-Adalia, and F. Sanchez-Madrid. 2010b. The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 126:355-365, 365 e351-353.
- Martin, P., and F. Sanchez-Madrid. 2011. CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses. *Sci Signal* 4:pe14.
- Mascanfroni, I.D., M.C. Takenaka, A. Yeste, B. Patel, Y. Wu, J.E. Kenison, S. Siddiqui, A.S. Basso, L.E. Otterbein, D.M. Pardoll, F. Pan, A. Priel, C.B. Clish, S.C. Robson, and F.J. Quintana.

2015. Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat Med* 21:638-646.
- Matkovich, S.J., Y. Hu, W.H. Eschenbacher, L.E. Dorn, and G.W. Dorn, 2nd. 2012. Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy. *Circ Res* 111:521-531.
- Matloubian, M., C.G. Lo, G. Cinamon, M.J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M.L. Allende, R.L. Proia, and J.G. Cyster. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427:355-360.
- Matusiewicz, D., P. Kivisakk, B. He, N. Kostulas, V. Ozenci, S. Fredrikson, and H. Link. 1999. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5:101-104.
- McGeachy, M.J., K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, and D.J. Cua. 2007. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8:1390-1397.
- McHugh, R.S., M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, and M.C. Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311-323.
- Melnik, B.C., S.M. John, and G. Schmitz. 2014. Milk: an exosomal microRNA transmitter promoting thymic regulatory T cell maturation preventing the development of atopy? *J Transl Med* 12:43.
- Mellor, A.L., and D.H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4:762-774.
- Mezrich, J.D., J.H. Fechner, X. Zhang, B.P. Johnson, W.J. Burlingham, and C.A. Bradfield. 2010. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* 185:3190-3198.
- Miossec, P., T. Korn, and V.K. Kuchroo. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361:888-898.
- Miranda, K.C., T. Huynh, Y. Tay, Y.S. Ang, W.L. Tam, A.M. Thomson, B. Lim, and I. Rigoutsos. 2006. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126:1203-1217.
- Mitchell, P.S., R.K. Parkin, E.M. Kroh, B.R. Fritz, S.K. Wyman, E.L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K.C. O'Brian, A. Allen, D.W. Lin, N. Urban, C.W. Drescher, B.S. Knudsen, D.L. Stirewalt, R. Gentleman, R.L. Vessella, P.S. Nelson, D.B. Martin, and M. Tewari. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10513-10518.
- Mittelbrunn, M., C. Gutierrez-Vazquez, C. Villarroya-Beltri, S. Gonzalez, F. Sanchez-Cabo, M.A. Gonzalez, A. Bernad, and F. Sanchez-Madrid. 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications* 2:282.
- Molet, S., Q. Hamid, F. Davoine, E. Nutku, R. Taha, N. Page, R. Olivenstein, J. Elias, and J. Chakir. 2001. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 108:430-438.
- Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
- Muranski, P., and N.P. Restifo. 2013. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* 121:2402-2414.
- Murray, I.A., J.L. Morales, C.A. Flaveny, B.C. Dinatale, C. Chiaro, K. Gowdahalli, S. Amin, and G.H. Perdew. 2010. Evidence for ligand-mediated selective modulation of aryl hydrocarbon receptor activity. *Mol Pharmacol* 77:247-254.

- Murugaiyan, G., V. Beynon, A. Mittal, N. Joller, and H.L. Weiner. 2011. Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 187:2213-2221.
- Nakae, S., Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano, and Y. Iwakura. 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17:375-387.
- Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171:6173-6177.
- Nakahama, T., H. Hanieh, N.T. Nguyen, I. Chinen, B. Ripley, D. Millrine, S. Lee, K.K. Nyati, P.K. Dubey, K. Chowdhury, Y. Kawahara, and T. Kishimoto. 2013. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the microRNA-132/212 cluster promotes interleukin-17-producing T-helper cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:11964-11969.
- Nguyen, L.P., and C.A. Bradfield. 2008. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 21:102-116.
- Nguyen, N.T., H. Hanieh, T. Nakahama, and T. Kishimoto. 2013. The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *Int Immunol* 25:335-343.
- Nishikawa, K., T. Morii, H. Ako, K. Hamada, S. Saito, and N. Narita. 1992. In vivo expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 90:169-174.
- Noutsias, M., M. Rohde, K. Goldner, A. Block, K. Blunert, L. Hemaidan, M. Hummel, J.H. Blohm, D. Lassner, U. Kuhl, H.P. Schultheiss, H.D. Volk, and K. Kotsch. 2011. Expression of functional T-cell markers and T-cell receptor Vbeta repertoire in endomyocardial biopsies from patients presenting with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *European journal of heart failure* 13:611-618.
- Nurieva, R., X.O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A.D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S.S. Watowich, A.M. Jetten, and C. Dong. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448:480-483.
- O'Connell, R.M., D. Kahn, W.S. Gibson, J.L. Round, R.L. Scholz, A.A. Chaudhuri, M.E. Kahn, D.S. Rao, and D. Baltimore. 2010. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 33:607-619.
- O'Connell, R.M., D.S. Rao, and D. Baltimore. 2012. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 30:295-312.
- O'Shea, J.J., and W.E. Paul. 2010. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327:1098-1102.
- Oerlemans, M.I., A. Mosterd, M.S. Dekker, E.A. de Vrey, A. van Mil, G. Pasterkamp, P.A. Doevendans, A.W. Hoes, and J.P. Sluijter. 2012. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs. *EMBO molecular medicine* 4:1176-1185.
- Ohkura, N., Y. Kitagawa, and S. Sakaguchi. 2013. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38:414-423.
- Ono, M., J. Shimizu, Y. Miyachi, and S. Sakaguchi. 2006. Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein(high), Foxp3-expressing CD25+ and CD25- regulatory T cells. *J Immunol* 176:4748-4756.
- Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng. 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28:454-467.
- Palmer, D.C., and N.P. Restifo. 2009. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol* 30:592-602.
- Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133-1141.
- Pasquinelli, A.E. 2012. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 13:271-282.

- Peters, J.H., H.J. Koenen, E. Fasse, H.J. Tijssen, J.N. Ijzermans, P.J. Groenen, N.P. Schaap, J. Kwekkeboom, and I. Joosten. 2013. Human secondary lymphoid organs typically contain polyclonally-activated proliferating regulatory T cells. *Blood* 122:2213-2223.
- Pfaff, N., J. Fiedler, A. Holzmann, A. Schambach, T. Moritz, T. Cantz, and T. Thum. 2011. miRNA screening reveals a new miRNA family stimulating iPS cell generation via regulation of Meox2. *EMBO reports* 12:1153-1159.
- Pillai, R.S. 2005. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 11:1753-1761.
- Quintana, F.J. 2013. The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental control of the immune response. *Immunology* 138:183-189.
- Quintana, F.J., A.S. Basso, A.H. Iglesias, T. Korn, M.F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka, and H.L. Weiner. 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453:65-71.
- Quintana, F.J., H. Jin, E.J. Burns, M. Nadeau, A. Yeste, D. Kumar, M. Rangachari, C. Zhu, S. Xiao, J. Seavitt, K. Georgopoulos, and V.K. Kuchroo. 2012. Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing Il2 expression. *Nat Immunol* 13:770-777.
- Quintana, F.J., G. Murugaiyan, M.F. Farez, M. Mitsdoerffer, A.M. Tukupah, E.J. Burns, and H.L. Weiner. 2010. An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20768-20773.
- Qureshi, O.S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E.M. Schmidt, J. Baker, L.E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T.Z. Hou, C.E. Futter, G. Anderson, L.S. Walker, and D.M. Sansom. 2011. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332:600-603.
- Radstake, T.R., L. van Bon, J. Broen, M. Wenink, K. Santegoets, Y. Deng, A. Hussaini, R. Simms, W.W. Cruikshank, and R. Lafyatis. 2009. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. *PLoS One* 4:e5981.
- Radulovic, K., C. Manta, V. Rossini, K. Holzmann, H.A. Kestler, U.M. Wegenka, T. Nakayama, and J.H. Niess. 2012. CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential. *J Immunol* 188:2001-2013.
- Radulovic, K., V. Rossini, C. Manta, K. Holzmann, H.A. Kestler, and J.H. Niess. 2013. The Early Activation Marker CD69 Regulates the Expression of Chemokines and CD4 T Cell Accumulation in Intestine. *PLoS One* 8:e65413.
- Rangachari, M., N. Mauermann, R.R. Marty, S. Dirnhofer, M.O. Kurrer, V. Komnenovic, J.M. Penninger, and U. Eriksson. 2006. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med* 203:2009-2019.
- Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295-302.
- Rivera, J., R.L. Proia, and A. Olivera. 2008. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* 8:753-763.
- Rodriguez, A., E. Vigorito, S. Clare, M.V. Warren, P. Couttet, D.R. Soond, S. van Dongen, R.J. Grocock, P.P. Das, E.A. Miska, D. Vetrie, K. Okkenhaug, A.J. Enright, G. Dougan, M. Turner, and A. Bradley. 2007. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316:608-611.
- Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M.K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
- Ruprecht, C.R., M. Gattorno, F. Ferlito, A. Gregorio, A. Martini, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2005. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. *J Exp Med* 201:1793-1803.

- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
- Saldanha-Araujo, F., R. Haddad, K.C. Farias, P. Souza Ade, P.V. Palma, A.G. Araujo, M.D. Orellana, J.C. Voltarelli, D.T. Covas, M.A. Zago, and R.A. Panepucci. 2012. Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF-kappaB signalling. *Journal of cellular and molecular medicine* 16:1232-1244.
- Sanchez-Mateos, P., M. Cebrian, A. Acevedo, M. Lopez-Botet, M.O. De Landazuri, and F. Sanchez-Madrid. 1989. Expression of a gp33/27,000 MW activation inducer molecule (AIM) on human lymphoid tissues. Induction of cell proliferation on thymocytes and B lymphocytes by anti-AIM antibodies. *Immunology* 68:72-79.
- Sancho, D., M. Gomez, F. Viedma, E. Esplugues, M. Gordon-Alonso, M.A. Garcia-Lopez, H. de la Fuente, A.C. Martinez, P. Lauzurica, and F. Sanchez-Madrid. 2003. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 112:872-882.
- Sardella, G., L. De Luca, V. Francavilla, D. Accapezzato, M. Mancone, M.I. Sirinian, F. Fedele, and M. Paroli. 2007. Frequency of naturally-occurring regulatory T cells is reduced in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Thrombosis research* 120:631-634.
- Satoh, M., Y. Minami, Y. Takahashi, T. Tabuchi, and M. Nakamura. 2010. Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. *Journal of cardiac failure* 16:404-410.
- Schroen, B., and S. Heymans. 2012. Small but smart--microRNAs in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing. *Cardiovascular research* 93:605-613.
- Seddiki, N., V. Brezar, N. Ruffin, Y. Levy, and S. Swaminathan. 2014. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease. *Immunology* 142:32-38.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S.I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St Groth. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203:1693-1700.
- Shi, Y., M. Fukuoka, G. Li, Y. Liu, M. Chen, M. Konviser, X. Chen, M.A. Opavsky, and P.P. Liu. 2010. Regulatory T cells protect mice against coxsackievirus-induced myocarditis through the transforming growth factor beta-coxsackie-adenovirus receptor pathway. *Circulation* 121:2624-2634.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135-142.
- Shiow, L.R., D.B. Rosen, N. Brdickova, Y. Xu, J. An, L.L. Lanier, J.G. Cyster, and M. Matloubian. 2006. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440:540-544.
- Silverstein, A.M. 2003. Cellular versus humoral immunology: a century-long dispute. *Nat Immunol* 4:425-428.
- Singh, N.P., U.P. Singh, B. Singh, R.L. Price, M. Nagarkatti, and P.S. Nagarkatti. 2011. Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. *PLoS One* 6:e23522.
- Smith, S.C., and P.M. Allen. 1991. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *J Immunol* 147:2141-2147.
- Smith, S.C., and P.M. Allen. 1993. The role of T cells in myosin-induced autoimmune myocarditis. *Clinical immunology and immunopathology* 68:100-106.

- Sonderegger, I., G. Iezzi, R. Maier, N. Schmitz, M. Kurrer, and M. Kopf. 2008. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J Exp Med* 205:2281-2294.
- Sonderegger, I., T.A. Rohn, M.O. Kurrer, G. Iezzi, Y. Zou, R.A. Kastelein, M.F. Bachmann, and M. Kopf. 2006. Neutralization of IL-17 by active vaccination inhibits IL-23-dependent autoimmune myocarditis. *Eur J Immunol* 36:2849-2856.
- Soshilov, A., and M.S. Denison. 2011. Ligand displaces heat shock protein 90 from overlapping binding sites within the aryl hydrocarbon receptor ligand-binding domain. *J Biol Chem* 286:35275-35282.
- Stahl, H.F., T. Fauti, N. Ullrich, T. Bopp, J. Kubach, W. Rust, P. Labhart, V. Alexiadis, C. Becker, M. Hafner, A. Weith, M.C. Lenter, H. Jonuleit, E. Schmitt, and D. Mennerich. 2009. miR-155 inhibition sensitizes CD4⁺ Th cells for TREG mediated suppression. *PLoS One* 4:e7158.
- Sun, X., and M.W. Feinberg. 2012. Knocking out viral myocarditis: reality or a miRage? *Circ Res* 111:388-391.
- Swat, W., M. Dessing, H. von Boehmer, and P. Kisielow. 1993. CD69 expression during selection and maturation of CD4⁺8⁺ thymocytes. *Eur J Immunol* 23:739-746.
- Tada, T., T. Takemori, K. Okumura, M. Nonaka, and T. Tokuhisa. 1978. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia⁺ helper T cells. *J Exp Med* 147:446-458.
- Takahashi, R., S. Nishimoto, G. Muto, T. Sekiya, T. Tamiya, A. Kimura, R. Morita, M. Asakawa, T. Chinen, and A. Yoshimura. 2011. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. *J Exp Med* 208:2055-2067.
- Tanaka, K., K. Ichiyama, M. Hashimoto, H. Yoshida, T. Takimoto, G. Takaesu, T. Torisu, T. Hanada, H. Yasukawa, S. Fukuyama, H. Inoue, Y. Nakanishi, T. Kobayashi, and A. Yoshimura. 2008. Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN- γ on STAT3 and Smads. *J Immunol* 180:3746-3756.
- Testi, R., D. D'Ambrosio, R. De Maria, and A. Santoni. 1994. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 15:479-483.
- Testi, R., J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 1989. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol* 143:1123-1128.
- Testi, R., F. Pulcinelli, L. Frati, P.P. Gazzaniga, and A. Santoni. 1990. CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J Exp Med* 172:701-707.
- Thum, T., P. Galuppo, C. Wolf, J. Fiedler, S. Kneitz, L.W. van Laake, P.A. Doevendans, C.L. Mummery, J. Borlak, A. Haverich, C. Gross, S. Engelhardt, G. Ertl, and J. Bauersachs. 2007. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 116:258-267.
- Tijssen, A.J., E.E. Creemers, P.D. Moerland, L.J. de Windt, A.C. van der Wal, W.E. Kok, and Y.M. Pinto. 2010. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 106:1035-1039.
- Tsai, C.Y., S.R. Allie, W. Zhang, and E.J. Usherwood. 2013. MicroRNA miR-155 affects antiviral effector and effector Memory CD8 T cell differentiation. *Journal of virology* 87:2348-2351.
- Tserel, L., T. Runnel, K. Kisand, M. Pihlap, L. Bakhoff, R. Kolde, H. Peterson, J. Vilo, P. Peterson, and A. Rebane. 2011. MicroRNA expression profiles of human blood monocyte-derived dendritic cells and macrophages reveal miR-511 as putative positive regulator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 286:26487-26495.
- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J.J. Lee, and J.O. Lotvall. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* 9:654-659.

- van de Vrie, M., S. Heymans, and B. Schroen. 2011. MicroRNA involvement in immune activation during heart failure. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 25:161-170.
- van den Hoogen, P., F. van den Akker, J.C. Deddens, and J.P. Sluiter. 2015. Heart Failure in Chronic Myocarditis: A Role for microRNAs? *Current genomics* 16:88-94.
- van Kouwenhove, M., M. Kedde, and R. Agami. 2011. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer* 11:644-656.
- van Rooij, E., and S. Kauppinen. 2014. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO molecular medicine* 6:851-864.
- van Rooij, E., W.S. Marshall, and E.N. Olson. 2008. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res* 103:919-928.
- Vang, K.B., J. Yang, S.A. Mahmud, M.A. Burchill, A.L. Vegoe, and M.A. Farrar. 2008. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* 181:3285-3290.
- Vanhecke, D., G. Leclercq, J. Plum, and B. Vandekerckhove. 1995. Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69+CD3+ thymocytes and identification of thymic emigrants. *J Immunol* 155:1862-1872.
- Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318:1931-1934.
- Veldhoen, M., K. Hirota, J. Christensen, A. O'Garra, and B. Stockinger. 2009. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J Exp Med* 206:43-49.
- Veldhoen, M., K. Hirota, A.M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J.C. Renauld, and B. Stockinger. 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453:106-109.
- Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
- Vickers, K.C., B.T. Palmisano, B.M. Shoucri, R.D. Shamburek, and A.T. Remaley. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology* 13:423-433.
- Vigorito, E., K.L. Perks, C. Abreu-Goodger, S. Bunting, Z. Xiang, S. Kohlhaas, P.P. Das, E.A. Miska, A. Rodriguez, A. Bradley, K.G. Smith, C. Rada, A.J. Enright, K.M. Toellner, I.C. MacLennan, and M. Turner. 2007. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 27:847-859.
- Vitales-Noyola, M., L. Doniz-Padilla, C. Alvarez-Quiroga, A. Monsivais-Urenda, H. Portillo-Salazar, and R. Gonzalez-Amaro. 2015. Quantitative and functional analysis of CD69(+) NKG2D(+) T regulatory cells in healthy subjects. *Hum Immunol* 76:511-518.
- Vogel, B., A. Keller, K.S. Frese, P. Leidinger, F. Sedaghat-Hamedani, E. Kayvanpour, W. Kloos, C. Backe, A. Thanaraj, T. Brefort, M. Beier, S. Hardt, E. Meese, H.A. Katus, and B. Meder. 2013. Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure. *Eur Heart J* 34:2812-2822.
- Voinnet, O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136:669-687.
- Wan, Y.Y., and R.A. Flavell. 2007. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445:766-770.
- Wang, G.K., J.Q. Zhu, J.T. Zhang, Q. Li, Y. Li, J. He, Y.W. Qin, and Q. Jing. 2010. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 31:659-666.
- Wang, Q., J. Chen, C.I. Ko, Y. Fan, V. Carreira, Y. Chen, Y. Xia, M. Medvedovic, and A. Puga. 2013. Disruption of aryl hydrocarbon receptor homeostatic levels during embryonic stem cell differentiation alters expression of homeobox transcription factors that control cardiomyogenesis. *Environmental health perspectives* 121:1334-1343.

- Wheeler, G., S. Ntounia-Fousara, B. Granda, T. Rathjen, and T. Dalmay. 2006. Identification of new central nervous system specific mouse microRNAs. *FEBS Lett* 580:2195-2200.
- Wienholds, E., and R.H. Plasterk. 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 579:5911-5922.
- Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855-862.
- Xing, Y., D. Gao, Z. Liu, and X. Niu. 2014. MicroRNAs in heart failure. *Chinese medical journal* 127:3328-3334.
- Xu, H.F., Y.J. Ding, Z.X. Zhang, Z.F. Wang, C.L. Luo, B.X. Li, Y.W. Shen, L.Y. Tao, and Z.Q. Zhao. 2014. MicroRNA21 regulation of the progression of viral myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Molecular medicine reports* 10:161-168.
- Yamashita, T., T. Iwakura, K. Matsui, H. Kawaguchi, M. Obana, A. Hayama, M. Maeda, Y. Izumi, I. Komuro, Y. Ohsugi, M. Fujimoto, T. Naka, T. Kishimoto, H. Nakayama, and Y. Fujio. 2011. IL-6-mediated Th17 differentiation through ROR γ is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovascular research* 91:640-648.
- Yang, J.S., and E.C. Lai. 2011. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell* 43:892-903.
- Yang, X.O., A.D. Panopoulos, R. Nurieva, S.H. Chang, D. Wang, S.S. Watowich, and C. Dong. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 282:9358-9363.
- Yang, X.O., B.P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H.S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A.D. Panopoulos, K.S. Schluns, S.S. Watowich, Q. Tian, A.M. Jetten, and C. Dong. 2008a. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 28:29-39.
- Yang, Y., W. Bai, L. Zhang, G. Yin, X. Wang, J. Wang, H. Zhao, Y. Han, and Y.Q. Yao. 2008b. Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237:2315-2327.
- Yao, R., Y. Ma, Y. Du, M. Liao, H. Li, W. Liang, J. Yuan, Z. Ma, X. Yu, H. Xiao, and Y. Liao. 2011. The altered expression of inflammation-related microRNAs with microRNA-155 expression correlates with Th17 differentiation in patients with acute coronary syndrome. *Cellular & molecular immunology* 8:486-495.
- Yao, R., Y.L. Ma, W. Liang, H.H. Li, Z.J. Ma, X. Yu, and Y.H. Liao. 2012. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. *PLoS One* 7:e46082.
- Yao, Z., W.C. Fanslow, M.F. Seldin, A.M. Rousseau, S.L. Painter, M.R. Comeau, J.I. Cohen, and M.K. Spriggs. 1995. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3:811-821.
- Yi, A., L. Jian, H. Xiaojing, and X. Hui. 2009. The prevalence of Th17 cells in patients with dilated cardiomyopathy. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale* 32:E144-150.
- Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7:454-465.
- Yoshimura, A., M. Suzuki, R. Sakaguchi, T. Hanada, and H. Yasukawa. 2012. SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. *Front Immunol* 3:20.
- Yuan, J., A.L. Cao, M. Yu, Q.W. Lin, X. Yu, J.H. Zhang, M. Wang, H.P. Guo, and Y.H. Liao. 2010. Th17 cells facilitate the humoral immune response in patients with acute viral myocarditis. *Journal of clinical immunology* 30:226-234.

- Zajac, A.J., J.N. Blattman, K. Murali-Krishna, D.J. Sourdive, M. Suresh, J.D. Altman, and R. Ahmed. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188:2205-2213.
- Zampetaki, A., S. Kiechl, I. Drozdov, P. Willeit, U. Mayr, M. Prokopi, A. Mayr, S. Weger, F. Oberhollenzer, E. Bonora, A. Shah, J. Willeit, and M. Mayr. 2010. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 107:810-817.
- Zernecke, A., K. Bidzhekov, H. Noels, E. Shagdarsuren, L. Gan, B. Denecke, M. Hristov, T. Koppel, M.N. Jahantigh, E. Lutgens, S. Wang, E.N. Olson, A. Schober, and C. Weber. 2009. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2:ra81.
- Zhan, Y., G.M. Davey, K.L. Graham, H. Kiu, N.L. Dudek, T. Kay, and A.M. Lew. 2009. SOCS1 negatively regulates the production of Foxp3⁺ CD4⁺ T cells in the thymus. *Immunol Cell Biol* 87:473-480.
- Zhang, F., G. Meng, and W. Strober. 2008a. Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 9:1297-1306.
- Zhang, L., J. Ma, M. Takeuchi, Y. Usui, T. Hattori, Y. Okunuki, N. Yamakawa, T. Kezuka, M. Kuroda, and H. Goto. 2010a. Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by inducing differentiation of regulatory T cells via activation of aryl hydrocarbon receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2109-2117.
- Zhang, S., C. Rowlands, and S. Safe. 2008b. Ligand-dependent interactions of the Ah receptor with coactivators in a mammalian two-hybrid assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 227:196-206.
- Zhang, Y., D. Liu, X. Chen, J. Li, L. Li, Z. Bian, F. Sun, J. Lu, Y. Yin, X. Cai, Q. Sun, K. Wang, Y. Ba, Q. Wang, D. Wang, J. Yang, P. Liu, T. Xu, Q. Yan, J. Zhang, K. Zen, and C.Y. Zhang. 2010b. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 39:133-144.
- Zhao, Q., D.M. Kuang, Y. Wu, X. Xiao, X.F. Li, T.J. Li, and L. Zheng. 2012. Activated CD69⁺ T cells foster immune privilege by regulating IDO expression in tumor-associated macrophages. *J Immunol* 188:1117-1124.
- Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman. 2009. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30:646-655.
- Zhou, L., Ivanov, I., R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D.E. Levy, W.J. Leonard, and D.R. Littman. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8:967-974.
- Zhou, L., J.E. Lopes, M.M. Chong, Ivanov, I., R. Min, G.D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y.P. Rubtsov, A.Y. Rudensky, S.F. Ziegler, and D.R. Littman. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* 453:236-240.
- Zhu, D., C. Pan, L. Li, Z. Bian, Z. Lv, L. Shi, J. Zhang, D. Li, H. Gu, C.Y. Zhang, Y. Liu, and K. Zen. 2013. MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein alpha. *J Allergy Clin Immunol* 132:426-436 e428.
- Zingoni, A., G. Palmieri, S. Morrone, M. Carretero, M. Lopez-Botel, M. Piccoli, L. Frati, and A. Santoni. 2000. CD69-triggered ERK activation and functions are negatively regulated by CD94 / NKG2-A inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 30:644-651.

ANEXOS

ANEXO I: Artículos publicados

- Martín P, Gómez M, Lamana A, Matesanz Marín A, Cortés JR, Ramírez-Huesca M, Barreiro O, López-Romero P, Gutiérrez-Vázquez C, de la Fuente H, Cruz-Adalia A, Sánchez-Madrid F (2010): “The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity”.
Journal of Allergy and Clinical Immunology, 126(2): 355-365. IF: 11.476
- Náchter M, Blázquez AB, Shao B, Matesanz A, Prophete C, Berin MC, Frenette PS, Hidalgo A (2011): “Physiological contribution of CD44 as a ligand for E-Selectin during inflammatory T-cell recruitment”.
The American Journal of Pathology, 178(5): 2437-46. IF: 7.429
- Cortés JR, Sánchez-Díaz R, Bovolenta ER, Barreiro O, Lasarte S, Matesanz-Marín A, Toribio ML, Sánchez-Madrid F, Martín P (2014): “Maintenance of immune tolerance by Foxp3+ regulatory T cells requires CD69 expression”.
Journal of Autoimmunity, 55:51-62. IF: 8.410
- Fabbiano S, Menacho-Marquez M, Robles-Valero J, Pericacho M, Matesanz-Marín A, García-Matas C, Sevilla MA, Montero MJ, Alarcon B, Lopez-Novoa JM, Martin P, Bustelo XR (2015): “Immunosuppression-independent role of regulatory T cells against hypertension-driven renal dysfunctions”.
Molecular and Cellular Biology, 35(20):3528-46. IF: 4.777
- Liappas G, González-Mateo GT, Sánchez-Díaz R, Lasarte S, Lazcano JJ, Matesanz-Marín A; Zur R, Ferrantelli E, Aguilera A, Fernández-Ruiz E, Beelen RHJ, Selgas R, Sánchez-Madrid F, Martín P, López-Cabrera M (2015): “Immune-regulatory molecule CD69 controls peritoneal fibrosis”.
Artículo en revisión en “*Journal of the American Society of Nephrology*”. IF: 9.34

ANEXO II: Material suplementario

Tabla S1. Análisis del microarray de miRNAs. Diferencia en los niveles de expresión de los miRNAs analizados en el microarray entre células CD69KO y WT CD4⁺ no polarizadas, linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro* estimulados de manera policlonal y linfocitos T_H17 diferenciados *in vitro* estimulados de manera antígeno específica (*up* indica que la expresión es mayor en las células CD69KO que en las WT; *down* indica que la expresión es menor en las células CD69KO que en las WT).

Nombre	KO vs WT					
	CD4 ⁺ naive		Th17 policlonal		Th17 Ag-específica	
	Diferencia	Regulación	Diferencia	Regulación	Diferencia	Regulación
mmu-let-7a	1,000	down	1,000	down	1,517	up
mmu-let-7b	1,026	down	1,583	down	1,581	up
mmu-let-7c	1,056	up	1,354	down	1,582	up
mmu-let-7d	1,049	up	1,114	up	1,057	up
mmu-let-7f	1,388	up	1,348	down	1,483	up
mmu-let-7g	1,244	up	1,087	down	1,193	up
mmu-let-7i	1,355	up	1,092	up	1,255	up
mmu-miR-103	1,125	down	2,961	up	1,345	up
mmu-miR-106a	1,657	up				
mmu-miR-106b	1,229	up	1,839	up	1,133	up
mmu-miR-107	1,205	down	1,593	up	1,333	up
mmu-miR-1224	1,497	down	3,047	down	2,008	down
mmu-miR-125a-3p			27,548	down	1,802	down
mmu-miR-130b	1,098	down	3,630	up	1,280	up
mmu-miR-132			25,000	up	1,337	up
mmu-miR-134					24,223	down
mmu-miR-139-5p			1,428	up		
mmu-miR-140	1,397	up				
mmu-miR-140*	1,396	down	2,114	up	1,328	up
mmu-miR-142-3p	1,373	up	1,747	up	1,510	up
mmu-miR-142-5p	1,284	down	1,645	up	1,565	up
mmu-miR-146a	1,079	up	1,390	down	2,053	up
mmu-miR-150	1,556	down	1,072	down	1,692	up
mmu-miR-155	1,141	down	4,264	up	1,816	down
mmu-miR-15a	1,707	up	1,115	down	1,900	up
mmu-miR-15b	1,000	down	1,337	up	1,337	down
mmu-miR-16	1,219	up	1,094	up	1,141	up
mmu-miR-17	2,394	up				
mmu-miR-17*	1,415	up	7,463	up	2,794	up

mmu-miR-181a					1,781	up
mmu-miR-181b					1,680	up
mmu-miR-188-5p	1,421	down	4,516	down	2,373	down
mmu-miR-18a	1,479	up			1,958	up
mmu-miR-19a	1,226	up			1,468	up
mmu-miR-19b	1,092	up	3,687	up	1,093	down
mmu-miR-202-3p	1,188	down	1,030	down	2,098	up
mmu-miR-206			48,371	down		
mmu-miR-20a	1,329	up	2,288	up	1,594	up
mmu-miR-20b	1,565	up	2,735	up	1,559	up
mmu-miR-21	1,752	up	1,497	up	1,497	down
mmu-miR-210	8,767	up				
mmu-miR-212	2,237	up				
mmu-miR-22	1,608	down	1,436	up	1,156	up
mmu-miR-223	7,765	down				
mmu-miR-23a	1,317	down	1,518	up	1,056	down
mmu-miR-23b	1,075	down	2,956	up	1,514	down
mmu-miR-24	1,126	up	2,908	up	1,178	down
mmu-miR-25	1,300	up	1,240	up	1,081	up
mmu-miR-26a	1,335	down	1,448	up	1,278	up
mmu-miR-26b	1,133	down	1,288	up	1,805	up
mmu-miR-27a	1,127	up	8,705	up	1,050	up
mmu-miR-27b	2,762	up	4,419	up	1,263	up
mmu-miR-294			3,936	down		
mmu-miR-296-5p					33,190	down
mmu-miR-297c			4,130	down		
mmu-miR-29a	1,291	down	1,203	up	1,373	down
mmu-miR-29b	1,129	up	2,091	up	1,186	up
mmu-miR-29b*	1,122	down	3,555	up		
mmu-miR-29c	1,993	down	2,991	up	1,365	up
mmu-miR-301a	5,072	up			5,641	up
mmu-miR-302c*			2,023	down		
mmu-miR-30b	1,033	down	5,981	up	1,038	down
mmu-miR-30c	1,000	down	2,170	up	1,119	up
mmu-miR-30c-1*			1,232	down		
mmu-miR-30d	1,286	down	1,074	down	1,150	up
mmu-miR-30e	1,000	down	3,276	up	1,935	up
mmu-miR-342-3p	1,250	down	1,149	up	1,048	up
mmu-miR-342-5p	1,369	up	1,049	up		
mmu-miR-345-5p	1,098	up	4,872	down	2,497	up
mmu-miR-34a	1,630	down	1,599	up	4,022	up
mmu-miR-361	1,645	down	3,064	up	1,188	up
mmu-miR-363	2,248	up				
mmu-miR-378	1,095	up	9,862	up		
mmu-miR-423-5p	1,397	down	2,625	down	2,469	up

mmu-miR-425	1,248	down	15,929	up	1,689	up
mmu-miR-466a-5p			15,680	down		
mmu-miR-466b-5p			8,934	down		
mmu-miR-466c-5p	1,000	down	1,477	down	60,215	down
mmu-miR-466f-5p			5,587	down	1,067	up
mmu-miR-466h	1,615	up	2,772	down	22,935	down
mmu-miR-467b	1,413	down				
mmu-miR-467c	1,295	up	3,769	down	6,393	down
mmu-miR-467e			22,519	down		
mmu-miR-468	1,175	up	1,801	down	57,242	down
mmu-miR-483					130,451	down
mmu-miR-494	1,184	down	1,237	up	1,231	up
mmu-miR-500	1,320	up	1,269	down	48,963	down
mmu-miR-539			34,475	down		
mmu-miR-574-5p	1,149	up	2,004	down	2,775	down
mmu-miR-652	1,116	down	1,319	up	1,075	down
mmu-miR-669a	1,038	up	1,500	down	3,319	down
mmu-miR-669b	1,803	up	3,107	down	40,011	down
mmu-miR-669c	1,026	up	1,533	down	3,554	down
mmu-miR-670			38,366	down		
mmu-miR-671-5p			3,910	down	18,883	down
mmu-miR-672	1,033	up	2,793	down	26,521	down
mmu-miR-680			61,438	down	3,480	down
mmu-miR-685	5,356	down	3,013	down	1,645	up
mmu-miR-689	1,594	down	3,812	down	4,010	down
mmu-miR-690	1,331	down	1,725	down	1,136	up
mmu-miR-705			6,640	down	9,047	down
mmu-miR-706			3,690	down	15,096	down
mmu-miR-709	1,852	down	1,178	down	1,989	up
mmu-miR-711			5,126	down	1,067	up
mmu-miR-714	1,130	up	1,596	down	4,074	down
mmu-miR-715					4,189	down
mmu-miR-720	1,000	down	1,532	up	2,293	up
mmu-miR-721					189,673	down
mmu-miR-7a	2,005	up	3,031	up		
mmu-miR-801	6,156	down	1,447	down	1,000	down
mmu-miR-92a	1,171	down	1,142	down	1,135	down
mmu-miR-93	1,240	up	6,963	up	1,596	up
mmu-miR-98	3,351	up				